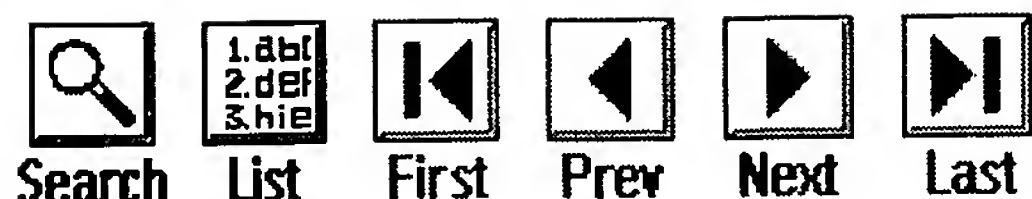


[HOME](#)
[PATENTWEB](#)
[TRADEMARKWEB](#)
[WHAT'S NEW](#)
[PRODUCTS & SERVICES](#)
[ABOUT MICROPATENT](#)



MicroPatent's Patent Index Database: [Complete Family of WO9501994A1]

5 record(s) found in the family

[Order Selected Patent\(s\)](#)

[no drawing available]

AU7326594A ☐ **19950206**

Title: (ENG) Recombinant ctla4 polypeptides and methods for making the same

Application Number: AU 7326594 D

Application (Filing) Date: 19940708

Priority Data: US 9053393 19930709 A X; US 9407685 19940708 W X;

Inventor(s): COX GEORGE N ; PRATT DICKSON G

Assignee/Applicant/Grantee: SYNERGEN INC

IPC (International Class): C07K014705; C12N01562; C12N00121; A61K03817

Other Abstracts for Family Members: DERABS C95-066865

Legal Status: There is no Legal Status information available for this patent

[no drawing available]

CA2144319A1 ☐ **19950119**

Title: (ENG) RECOMBINANT CTLA4 POLYPEPTIDES AND METHODS FOR MAKING THE SAME

Abstract: The present invention relates to recombinantly-produced CTLA4 polypeptides having B7 binding activity that are not the product of a fusion between CTLA4 and human Ig genes. The CTLA4 polypeptides of the present invention generally contain an amino acid sequence corresponding to the extracellular domain of the CTLA4 receptor protein. The invention further provides functional derivatives of the CTLA4 polypeptides, including muteins and conjugates containing polyethylene glycol. Methods for preparing the recombinant CTLA4 polypeptides are also provided, as well as methods for separating the monomeric and dimeric forms of the recombinant polypeptides as well as active and less active dimer forms.

Application Number: CA 2144319 A

Application (Filing) Date: 19940708

Priority Data: US 9053393 19930709 A X;

Inventor(s): COX GEORGE N US ; PRATT DICKSON G US

Assignee/Applicant/Grantee: SYNERGEN INC US

Last Modification Date: 20051114

IPC (International Class): C12N01562; C12N01512; A61K03817; C12N00121; C07K014725

Publication Language: ENG

Legal Status: There is no Legal Status information available for this patent

[EPO Register](#)

EP0665852A1 ☐ **19950809** [FullText](#)

Title: (ENG) RECOMBINANT CTLA4 POLYPEPTIDES AND METHODS FOR MAKING THE SAME

ENGLISH Abstract for JP ref. no. 33

10/642 409

1064

Application Number: EP 94923387 A

Application (Filing) Date: 19940708

Priority Data: US 9053393 19930709 A X; US 9407685 19940708 W X;

Inventor(s): COX GEORGE N US ; PRATT DICKSON G US

Assignee/Applicant/Grantee: SYNERGEN INC US

Last Modification Date: 20041102

IPC (International Class): C07K014705; C12N01562; C12N00121; A61K03817; C12N00121; C12R001

Designated Countries:

- Designated States: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

Publication Language: ENG

Agent(s): Gruenecker, Kinkeldey, Stockmair & SchwanhaeusserAnwaltssozietat 00100721 Maximilianstrasse 58
80538 Muenchen DE

Other Abstracts for Family Members: CHEMABS122(19)230773W; DERABS C95-066865

Non-Patent Citations:

- See references of WO 9501994A1

Legal Status:

Date +/-Code Description

19950809(+)AK DESIGNATED CONTRACTING STATES: Kind code of corresponding patent document: A1; AT
BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

19950913(+)17P REQUEST FOR EXAMINATION FILED Effective date: 19950717;

19951102 RAP1APPLICANT REASSIGNMENT (CORRECTION) New owner name: AMGEN BOULDER INC.;

19970730 (-) 18D DEEMED TO BE WITHDRAWN Effective date: 19970204;

Additional Information:

- No A-document published by the EPO
- Date of Application deemed Withdrawn 19970204
- Date of request for examination 19950717
- Patent bulletin/ gazette information 19970730 199731
- PCT application data US9407685 19940708 ENG
- PCT publication data WO9501994 19950119 199504

[no drawing available]

JP8506247T ☐ **19960709** [FullText](#)

Application Number: JP 50418694 T

Application (Filing) Date: 19940708

Priority Data: US 9053393 19930709 A X; US 9407685 19940708 W X;

IPC (International Class): C12N01509; A61K03800; C07K014705; C12N00121; C12P02102

Other Abstracts for Family Members: CHEMABS122(19)230773W; DERABS C95-066865

Legal Status: There is no Legal Status information available for this patent

EPO Register

WO9501994A1 ☐ **19950119** [FullText](#)

Title: (ENG) RECOMBINANT CTLA4 POLYPEPTIDES AND METHODS FOR MAKING THE SAME

Abstract: (ENG) The present invention relates to recombinantly-produced CTLA4 polypeptides having B7 binding activity that are not the product of a fusion between CTLA4 and human Ig genes. The CTLA4 polypeptides of the present invention generally contain an amino acid sequence corresponding to the extracellular domain of the CTLA4 receptor protein. The invention further provides functional derivatives of the CTLA4 polypeptides, including muteins and conjugates containing polyethylene glycol. Methods for preparing the recombinant CTLA4

10/642,409

english Abstract for JP ref. no. 33

284

polypeptides are also provided, as well as methods for separating the monomeric and dimeric forms of the recombinant polypeptides as well as active and less active dimer forms.

Application Number: US 9407685 W

Application (Filing) Date: 19940708

Priority Data: US 9053393 19930709 A I;

Inventor(s): COX GEORGE N US ; PRATT DICKSON G US

Assignee/Applicant/Grantee: SYNERGEN INC US; COX GEORGE N US; PRATT DICKSON G US

Last Modification Date: 20041215

IPC (International Class): C07K014705; C12N01562; C12N00121; A61K03817; C12N00121; C12R001

ECLA (European Class): C07K001107; C07K001113D2; C07K014705B18

Designated Countries:

- Designated States: AT AU BB BG BR BY CA CH CN CZ DE DK ES FI GB HU JP KP KR LK LU LV MG MN MW NL NO NZ PL PT RO RU SD SE SK UA US UZ VN
- Regional Treaties: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE BF BJ CF CG CI CM GA GN ML MR NE SN TD TG

Publication Language: ENG

Other Abstracts for Family Members: CHEMABS122(19)230773W; DERABS C1995-066865

Other Abstracts for This Document: CHEMABS122(19)230773W; DERABS C1995-066865

Patents Cited:

- EP0613944 A E 0
- WO9300431 A XD 0

Patents Citing This One (6):

- US6750334B1 20040615 REPLIGEN CORP US
CTLA4-immunoglobulin fusion proteins having modified effector functions and uses therefor
- US6682736B1 20040127 ABGENIX INC US; PFIZER US
Human monoclonal antibodies to CTLA-4
- US6051227A 20000418 UNIV CALIFORNIA US
Blockade of T lymphocyte down-regulation associated with CTLA- 4 signaling
- US5855887A 19990105 UNIV CALIFORNIA US
Blockade of lymphocyte down-regulation associated with CTLA-4 signaling
- US5811097A 19980922 UNIV CALIFORNIA US
Blockade of T lymphocyte down-regulation associated with CTLA- 4 signaling
- EP0947582A1 19991006 INNOGENETICS NV BE
A polypeptide structure for use as a scaffold

Legal Status:

Date	+/-Code	Description
19950119(+)	AK	DESIGNATED STATES Kind code of corresponding patent document: A1; AT AU BB BG BR BY CA CH CN CZ DE DK ES FI GB HU JP KP KR LK LU LV MG MN MW NL NO NZ PL PT RO RU SD SE SK UA US UZ VN
19950119(+)	AL	DESIGNATED COUNTRIES FOR REGIONAL PATENTS Kind code of corresponding patent document: A1; AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE BF BJ CF CG CI CM GA GN ML MR NE SN TD TG
19950309	ENP	ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE IN: : CA; Corresponding patent document: 2144319; Kind code of corresponding patent document: A;
19950309	ENP	ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE IN: : US; Corresponding patent document: 1995 397179; Publication date of corresponding patent document: 19950309; Kind code of corresponding patent document: A;
19950426	121	EP: THE EPO HAS BEEN INFORMED BY WIPO THAT EP WAS DESIGNATED IN THIS APPLICATION
19960502	REG	REFERENCE TO NATIONAL CODE : DE; : 8642;



Search



List



First



Prev



Next



Last

english abstract for JP ref. no. 33

10/642,409

3 of 4

Copyright © 2002, MicroPatent, LLC. The contents of this page are the property of MicroPatent LLC including without limitation all text, html, asp, javascript and xml. All rights herein are reserved to the owner and this page cannot be reproduced without the express permission of the owner.

english abstract for JP ref. no. 33

10/642,409

4 00 4

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-506247

(43) 公表日 平成8年(1996)7月9日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
A 6 1 K 38/00	A B B		
C 0 7 K 14/705	Z N A	8318-4H	
		9281-4B	C 1 2 N 15/00
		9455-4C	A 6 1 K 37/02
			Z N A A
			A B B
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 68 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平7-504186	(71) 出願人	アムジェン ボールダー インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成6年(1994)7月8日		アメリカ合衆国 コロラド 80301, ボールダー, 33アールディー ストリート 1885
(85) 翻訳文提出日	平成7年(1995)3月9日	(72) 発明者	コックス, ジョージ エヌ.
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 4 / 0 7 6 8 5		アメリカ合衆国 コロラド 80027, ルイスビル, ウェスト ウィロー ストリート 678
(87) 国際公開番号	W O 9 5 / 0 1 9 9 4	(72) 発明者	ブラット, ディクソン ジー.
(87) 国際公開日	平成7年(1995)1月19日		アメリカ合衆国 コロラド 80301, ボールダー, ウェリントン ロード 4489
(31) 優先権主張番号	0 8 / 0 9 0 , 5 3 3	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	1993年7月9日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えCTLA4ポリペプチドおよびその製造方法

(57) 【要約】

本発明は、B7結合活性を有する組換え的に生産されたCTLA4ポリペプチドに関し、このポリペプチドは、CTLA4とヒトIg遺伝子との間の融合物による産物ではない。本発明のCTLA4ポリペプチドは、一般にCTLA4レセプタータンパク質の細胞外ドメインに対応するアミノ酸配列を含む。本発明は、さらに、ポリエチングリコールを含む変異タンパク質および結合体を含むCTLA4ポリペプチドの機能的誘導体を提供する。組換えCTLA4ポリペプチドを調製する方法がまた提供され、ならびに組換えポリペプチドのモノマー性およびダイマー性形態を分離する方法、ならびに活性および低活性のダイマー形態を分離する方法が提供される。

【特許請求の範囲】

1. (a) 配列番号：2のアミノ酸配列、またはN末端にメチオニンを有する配列番号：2のアミノ酸配列から本質的になる少なくとも1種の組換え的に生産されたモノマー、または (b) 該モノマーの機能的誘導体、
を含有するCTLA4ポリペプチドであって、B7に結合し得る、CTLA4ポリペプチド。
2. 前記モノマーが、配列番号：2のアミノ酸配列から本質的になる、請求項1に記載のCTLA4ポリペプチド。
3. 前記モノマーが、N末端メチオニンを有する配列番号：2のアミノ酸配列から本質的になる、請求項1に記載のCTLA4ポリペプチド。
4. 前記機能的誘導体が、少なくとも1つの遊離のシステインを有するCTLA4突然変異タンパク質を包含する、請求項1に記載のCTLA4ポリペプチド。
5. ポリエチレングルコール (PEG) 分子が、前記CTLA4ポリペプチドに結合した、請求項1に記載のCTLA4ポリペプチド。
6. 前記ポリペプチドがモノマーである、請求項1に記載のCTLA4ポリペプチド。
7. 前記ポリペプチドがマルチマーである、請求項1に記載のCTLA4ポリペプチド。
8. 前記ポリペプチドがダイマーである、請求項1に記載のCTLA4ポリペプチド。
9. 前記ダイマーが、PEG分子により架橋された2つのCTLA4ポリペプチドモノマーを含有する、請求項8に記載のCTLA4ポリペプチド。
10. 前記ダイマーが、ジスルフィド結合により結合した2つのCTLA4ポリペプチドモノマーを含有する、請求項8に記載のCTLA4ポリペプチド。
11. 前記ポリペプチドが、原核生物宿主細胞中で組換え的に生産される、請求項1に記載のCTLA4ポリペプチド。
12. 請求項1に記載のCTLA4ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列から本質的になるベクター。

13. 前記ヌクレオチド配列が、CTLA4ポリペプチドを発現するための作動可能なエレメントを含有する、請求項12に記載のベクター。

14. 前記ヌクレオチド配列が配列番号：1の配列である、請求項12に記載のベクター。

15. 請求項12のベクターを含有する宿主細胞。

16. 前記宿主細胞がE.coliである、請求項15に記載の宿主細胞。

17. 薬学的に受容可能なキャリア中に請求項1に記載のCTLA4ポリペプチドを含有する薬学的組成物。

18. 請求項1に記載の組換えCTLA4ポリペプチドを製造するための方法であって、以下の工程を包含する方法：

(a) 宿主細胞が組換えCTLA4ポリペプチドを発現するように仕向け得るDNA配列を得る工程；

(b) 該DNA配列を、該DNA配列を発現するための作動可能なエレ

メントを有するベクター中に挿入する工程；

(c) 該ベクターを、該ポリペプチドを発現し得る宿主細胞中に転移する工程；

(d) 該ポリペプチド発現のための条件下で、該宿主細胞を培養する工程；

(e) 該ポリペプチドを回収する工程；および

(f) 該ポリペプチドが、活性な三次構造となることを許容する工程。

19. 前記工程(f)で変性剤としてグアニジンが使用される、請求項18に記載の方法。

20. グアニジンが0.5Mから4.0Mの濃度で使用される、請求項19に記載の方法。

21. さらに、工程(f)の後に、前記ポリペプチドがマルチマーを形成する活性な四次構造となることを許容する工程を包含する、請求項18に記載の方法。

22. 前記マルチマーがダイマーである、請求項21の方法。

23. 請求項18に記載の組換え的に生産されたCTLA4ポリペプチドのモノマー性形態およびダイマー性形態を実質的に分離するための方法であって、以下の

工程を包含する方法：

- (a) 該CTLA4ポリペプチド形態の混合物をイオン交換カラムに通す工程；および
- (b) 工程 (a) で得られる混合物をサイジングカラムに通し、CTLA4モノマー性およびダイマー性形態を実質的に分離する工程。

24. 請求項18に記載の組換え的に生産されたCTLA4ポリペプチドのより低活性なダイマーから活性なダイマーを実質的に分離する方法であって、以下の工程を包含する方法：

- (a) 該CTLA4ポリペプチドの活性およびより低活性のダイマーの混合物をイオン交換カラムに通す工程；および
- (b) 該工程 (a) で得られる混合物を、サイジングカラムまたは疎水性相互作用カラムに通しより低活性のダイマーから活性ダイマーを実質的に分離する工程。

25. 前記工程 (a) で得られる混合物を、前記サイジングカラムおよび前記疎水性相互作用カラムに通す、請求項24に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

組換えCTLA4ポリペプチドおよびその製造方法

本発明はT細胞の活性化を制御するために有用な可溶性タンパク質に関し、そしてより特定すれば、組換えDNA法によって製造される可溶性CTLA4タンパク質に関する。

発明の背景

不適切なT細胞の活性化は、自己免疫疾患および移植の拒絶反応を包含するいくつもの有害な状態に関連している。クローン増殖のためのT細胞の最適な活性化は、2つのシグナルを必要とすると考えられている。ひとつは、T細胞レセプター (TCR) を通して送達される抗原特異的シグナルであり、第2には、抗原非特異的または共刺激的 (co-stimulatory) シグナルである。Chenら、Cell 71: 1093-1102(1992); Liuら、Eur. J. Immunol. 22:2855-2859(1992)。

第2の非特異的シグナルは、T細胞が増殖のために活性化されているか、あるいはクローンアネルギーとして知られる非反応状態に入っているかを決定する、共刺激物として知られるT細胞調節分子のクラスによって測定される。T細胞調節分子であるB7は、活性化マクロファージ、活性化Bリンパ球、および樹枝状細胞のような抗原提示細胞の細胞表面上に発現する共刺激タンパク質であり、Razi-Wolfら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4210-4214(1992)およびFreemanら、J. Immunol. 139:326-3267(1992)に報告されている。

B7は、CD28およびCTLA4 (細胞溶解性Tリンパ球関連抗原第4) として知られるT細胞表面タンパク質の天然のリガンドである。CD28およびCTLA4は、そのアミノ酸配列中、特にトランスメンブランおよび細胞質ドメイン中で実質的に相同性があり、そしてそのため、T細胞共刺激経路において類似の機能を共に担っていると考えられている。B7は、CD28と比較すると、CTLA4に対してより高い親和性を有していることが知られている。

CD28は、本質的にほとんどのTリンパ球上で発現する。しかし、CTLA4は、非活性化細胞溶解性T細胞よりも、活性化細胞溶解性T細胞で優先的に発現される

ことが、Brunetら、Nature 328:267-270(1987)に記載されているDNAハイブリダイゼーション実験で測定された。CTLA4は活性化細胞溶解性Tリンパ球および活性化ヘルパーTリンパ球で発現されることが、現在知られている。

B7とCD28およびCTLA4の相互作用は、免疫応答の間の共刺激経路におけるT細胞の全活性化において重要な役割を果たしている。例えばモノクローナル抗体による、B7またはCD28活性の中和によって、外来抗原およびレクチンのようなポリクローナルアクティベーターに対する応答によるT細胞の増殖が妨げられる。B7活性の中和によって、T細胞がB細胞による抗体合成を誘導するヘルパー細胞として機能することもま

た、妨げられる。

T細胞増殖および抗体誘導における重要な役割に加えて、B7とCD28との相互作用はTリンパ球におけるサイトカイン合成を調節する。B7とCD28との相互作用によって調節されるサイトカインとして知られているものとしては、インターロイキン-2、腫瘍壊死因子 α および β 、 γ インターフェロンおよび顆粒球マクロファージコロニー刺激因子が含まれる (Gimmiら、Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 88:6575-6579(1991); Linsleyら、J. Exp. Med. 173:721-730(1991); およびThompsonら、Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 86:1333-1337(1989))。

これらのサイトカインの合成は、通常使用される、シクロスポリン（これは、菌代謝物であり、臓器移植が行われるか、あるいは自己免疫疾患にかかっている患者の免疫系を抑制するために使用される）などの免疫抑制剤では完全には阻害されない。従って、B7活性を有効に阻害する薬剤は、シクロスポリン治療の代替として使用され得、あるいはシクロスポリンと組み合わせて使用され得、T細胞増殖を阻害する追加の効果または相乗効果を提供すると考えられる。CD28とCTLA4は類似しているので、B7とCTLA4との相互作用もまたTリンパ球におけるサイトカインの合成を調節すると考えられる。

しかし、CTLA4の細胞外ドメインを、可溶性の、非融合タンパク質として発現させる試みは、成功していなかった。従って、PCT公開公報番号WO93/00431によれば、活性化CTLA4タン

パク質の成功した発現は、このタンパク質をダイマーとして形成させることができる発現系を必要とすると考えられる。なぜならこのタンパク質は天然ではダイマーとして見いだされると考えられるからである。このように、研究者は、適切な発現系を見いだす努力をしながら、融合タンパク質に焦点を合わせていた。

免疫グロブリン分子のF_c重鎖領域に結合したCTLA4の細胞外ドメインを含む融合タンパク質は、B7阻害活性を有する、可能性のある薬剤として開発されてきた。この融合タンパク質（「CTLA4-Ig」と称する）はLinsleyら、J. Exp. Med. 174:561-569(1991)およびPCT公開特許公報番号WO93/00431に記載されている。これらの出版物によれば、CTLA4-Ig融合タンパク質は哺乳動物細胞から、溶液中で凝集するジスルフィド結合したダイマータンパク質として分泌される。しかし、CTLA4の細胞外ドメインを哺乳動物細胞中の非融合タンパク質として発現させる試みは成功しなかった。融合タンパク質のIg部分はダイマー融合タンパク質の形成を促進し、これは哺乳動物細胞でプロセスされそして発現されることが可能である。Ig部分は、さらに、活性融合タンパク質を、馴化培地から、プロテインAアフィニティーカラムを用いて精製することを可能とする。プロテインAはIg分子のF_c領域に対して高い親和性を有する。

主要なCTLA4-Ig種の溶液中での分子量は、サイズ排除クロマトグラフィーに基づくと約200kDaであり、これもまた上記

Linsleyらに記載されている。哺乳動物細胞中で発現するCTLA4-Ig融合タンパク質のモノマー形態の分子量が約50kDaなので、溶液中の上記主要な種は、少なくとも4個のCTLA4-Ig分子の凝集複合体であると考えられる。

CTLA4-Ig融合タンパク質のB7阻害活性は、インビトロおよびインビボの両方の実験でテストされた。インビトロ実験では、CTLA4-Ig融合タンパク質はB7に結合し、そしてその活性を中和した。実際、CTLA4-Ig融合タンパク質は、CD28-Ig融合タンパク質と比較して、B7活性のより優れたインヒビターであった。これらのアッセイの結果は、B7が、CD28に対してよりも、より高い親和性でCTLA4と結合することを示した、先の実験とも一致する。CTLA4-Ig融合タンパク質は、上記Linsleyらによって報告された混合リンパ球反応において、T細胞の増殖を50%最

大阻害量30ng/mlで阻害することが見いだされた。この融合タンパク質はまた、Linsleyら、J. Exp. Med. 174:561-569(1991)に記載されたインビトロでの研究において、Bリンパ球による抗体の産生を刺激するヘルパーT細胞の能力を阻害した。

インビボで行われる実験では、CTLA4-Ig融合タンパク質は免疫抑制的であることが測定され、そしてマウスとラットの脾臓および心臓の同種移植における生存を延ばすことが可能であった (Lenschowら、Science 257:789-792(1992)およびTurkaら、Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 89:11102-11105(1992))。マウスの研究において、CTLA4-Igの投与の結果、脾

臓の同種移植が長期間にわたり受容された。この結果は、融合タンパク質が、移植を受けるマウスを外来組織に対して耐性にすることを示唆している。Linsleyら、Science 257:792-795(1992)に記載されている他の動物の研究もまた、CTLA4-Igが、羊赤血球のような外来抗原に対しての一次抗体反応を阻害し得ることを示していた。

CTLA4-Ig融合タンパク質は、ヒトの疾患の治療薬剤としては、いくつかの欠点を有している。この融合タンパク質は非天然由来分子なので、このタンパク質を受ける患者は、このタンパク質に対する免疫応答を現し得る。抗原性は、患者がこの治療薬剤をやめたとき、従って患者がもはや免疫抑制されておらずこの融合タンパク質に対して免疫応答できるようになったときに、より大きな問題になり得る。従って、CTLA4-Ig融合タンパク質を慢性疾患にかかっている患者に断続的に投与することは、抗原性が妨げ得る。加えて、マウス中でのCTLA4-Ig融合タンパク質の半減期は約4日であり、CTLA4-Igによる治療の中断から5週間後もなお、顕著なレベルの融合タンパク質がこの動物中から検出される。Linsleyら、Science 257:792-795(1992)。さらに、抗原提示細胞表面のB7に結合すると、融合タンパク質のIg部分は補体カスケードを活性化し得、この結果、細胞死および血液学的問題が起きる。最後に、CTLA4-Ig融合タンパク質は哺乳動物細胞中で発現させるが、これはコストのかかる組換えタンパク質生産方法である。

従って、T細胞活性化の共刺激経路を阻害することができる、さらなる治療用薬剤に対する要求がある。本発明はこの要求を満たし、そして関連する利点をも提供する。

本発明の要旨

本発明は、ヒトIg分子を含む融合タンパク質ではない、組換え的に生産されるCTLA4ポリペプチドに関する。可溶性の、組換えポリペプチドは、塩基性のユニットとして、CTLA4レセプタータンパク質の細胞外ドメインから本質的になるモノマーを含む。好ましくは、この組換えポリペプチドは、2個またはそれ以上のモノマーが、分子間ジスルフィド結合を介して、またはポリエチレングリコール(PEG)のような架橋剤を介して結合し、生物学的に活性なダイマーおよび他のマルチマーを形成する生成物である。

このポリペプチドはまた、モノマーおよびマルチマーの機能的誘導体、例えばシステイン変異タンパク質であり得る。ここでシステインは1個またはそれ以上のアミノ酸で置換されるか、または野生型CTLA4アミノ酸配列に付加される。この置換は、好ましくは、配列番号2に示されるように、CTLA4レセプタータンパク質の細胞外ドメインの残基番号79、80、81、109、110または111で行われ、他方、余分のシステインの追加は、好ましくは、天然由来CTLA4レセプタータンパク質のN末端から125番目の残基の後で行われる。他の機能的誘導体は、例えば、2個のシステイン変異タンパク質がPEG分子の各末端

の活性基を介して結合している、PEG化したダンベル型分子を包含する。

本発明はまた、組換えポリペプチドの製造方法を提供する。この方法は以下の工程を包含する：

(a) 宿主細胞が、CTLA4レセプタータンパク質の細胞外ドメインに対応するポリペプチドを発現するように仕向け得るDNA配列を得る工程であって、ここで上記ポリペプチドはB7結合活性を有している；

(b) 上記DNA配列を、上記DNAを発現するための作動可能なエレメントを有するベクター中に挿入する工程；

(c) 上記ベクターを、上記ポリペプチドを発現し得る宿主細胞中に転移する

工程；

(d) 上記ポリペプチド発現のための条件下で、上記宿主細胞を培養する工程

；

(e) 上記ポリペプチドを回収する工程；および

(f) 上記ポリペプチドが、活性な三次構造となることを許容する工程。任意に、このポリペプチドはまた、活性な四次構造もとれる。

組換えCTLA4ポリペプチドを発現させるのに有用なベクターおよび宿主細胞もまた提供される。加えて、本発明はさらに、CTLA4ポリペプチドを活性成分として含む薬学的組成物を提供する。

本発明はまた、組換え的に生産されたポリペプチドの種々の形態の分離方法、特にモノマーおよびダイマーの分離方法

に関する。本発明はまた、種々のダイマー種の分離、および低活性のダイマーからより活性なダイマーを精製する方法に関する。上記の方法によって、活性な、組換えポリペプチドを得た後、得られた混合物をイオン交換カラム、特にアニオン交換カラムに通して、次いでサイジングカラムを通過させる。これらの分離方法で、少なくとも約90%がダイマーの第1の混合物のプール、および少なくとも約85%がモノマーの第2のプールが生成される。これらの方法はまた、低活性なダイマーからより活性なダイマーを分離する。

発明の詳細な説明

本発明は、ヒトIg分子と非融合の可溶性の組換え製造したCTLA4ポリペプチドを提供する。本発明の新規な組換えポリペプチドは、種々の疾患を導き得る不適なT細胞の増幅を阻害するために有用である。

天然に存在する、または野生型のCTLA4タンパク質は、B7のリガンドであり、これはT細胞の活性化を導く共刺激経路に関わる細胞表面タンパク質である。ネズミおよびヒトCTLA4のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、Brunetら、Nature 328 : 267-270 (1987)、およびDariavachら、Eur. J. Immunol. 18 : 1901-1905 (1988) にそれぞれ報告されている。ヒトCTLA4タンパク質とネズミCTLA4タンパク質との間の全てのアミノ酸の相同性は、76%である。全長ヒトCTLA4タン

パク質の正確なアミノ酸配列は、1993年1月7日に公開された、PCT公

開公報第WO 93/00431号で提供される。

前述のように、非融合または末端切断されたCTLA4タンパク質を生成する初期の試みは、まだ成功していなかった。従って、本発明以前の生物学的に活性な組換えCTLA4タンパク質を得る方法は、融合タンパク質であるCTLA4の発現を包含した。さらに特定すると、融合タンパク質は、PCT公開公報第WO 93/00431号に、ヒト免疫グロブリン分子の重鎖領域（「CTLA4-Ig」タンパク質と呼ばれる）と融合したCTLA4の細胞外ドメインを含むと記載されている。この公開公報によれば、CTLA4レセプタータンパク質の細胞外ドメインの発現を成功させるには、タンパク質にダイマーを形成させる発現系が必要である。それと比べて、CTLA4タンパク質の非融合形態または末端切断形態は、活性形態では発現されない。この公開公報は、CTLA4-Ig融合タンパク質のIg部分が、ダイマー形成を促進し、そして従来のプロテインAアフィニティクロマトグラフィーによる融合タンパク質の精製を補助すると考えられていることをさらに示している。

本発明は、Ig融合タンパク質でない、生物学的に活性な可溶性組換えCTLA4ポリペプチド（sCTLA4）の製造方法の発見に基づく。本明細書で用いた用語「生物学的に活性」は、B7結合活性を呈示するポリペプチドのことを意味する。

本発明の組換え製造したCTLA4ポリペプチドは、基本的な単位として、本質的に野生型CTLA4レセプタータンパク質の細胞外ドメインから成るモノマーを有する。モノマーは、本質的

に配列番号：2のアミノ酸配列からなる。E. coliなどの原核宿主細胞中で発現したモノマーは、配列番号：2と類似であるがN末端にメチオニンを有するアミノ酸配列によりコードされている。モノマーに関して、本明細書で用いられる用語「本質的に成る」は、野生型CTLA4タンパク質の細胞外ドメインに対応するアミノ酸配列、またはヒトIg分子をコードするアミノ酸配列以外の付加的なアミノ酸に結合した細胞外ドメインに対応するアミノ酸配列によりコードされるモノマーを、包含することを意図している。CTLA4モノマー形態の計算上の分子量は、

約12.5~約13.5kDaである。組換え製造したsCTLA4モノマーは、非還元条件下でのSDS PAGEで、約14~約16kDaの範囲に2つの主要なバンドを呈していた。

本発明の組換えCTLA4ポリペプチドもまた、ダイマー形態または他のマルチマー形態をとり得、それらは1つ以上の基本的モノマー単位を含む。このようなマルチマーは、特にダイマーは、分子間のジスルフィド結合により、または架橋剤（例えば、ポリエチレングリコール（以下「PEG」と呼ぶ）、他のポリエーテル、EDTAおよび当業者に公知な他のリンカーなど）を介して2つ以上の分子を結合することにより形成され得る。分子間ジスルフィド結合により結合した2つのモノマーにより生成されるダイマー形態は、約25kDaの計算上の分子量を有し、そして非還元条件下でのSDS PAGEで、約24kDa~約27kDaの範囲に少なくとも3つの主要なバンドを呈する。本発明は、種々のダイマー形態を分離する方法および最も活性なダイマー

形態を精製する方法を提供する。

モノマー形態およびダイマー形態は、以下の実施例に記載のアッセイによると、生物学的に活性である。しかし、活性ダイマー形態は、これらのインビトロでの生物学的アッセイにおいて、CTLA4のモノマー形態よりもさらに約10倍~約100倍活性であることが見いだされた。

本発明は、組換えsCTLA4ポリペプチドの製造方法をさらに提供する。このような方法は、以下の工程：

(a) 宿主細胞に、B7結合活性を有するポリペプチドであるCTLA4レセプタータンパク質の細胞外ドメインに対応するポリペプチドを発現させ得るDNA配列を得る工程；

(b) DNA配列を、そのDNA配列を発現するための作動可能なエレメントを有するベクター中に挿入する工程；

(c) ベクターを、ポリペプチドを発現し得る宿主細胞に転移する工程；

(d) ポリペプチド発現のための条件下で、宿主細胞を培養する工程；

(e) ポリペプチドを回収する工程；および

(f) ポリペプチドが、活性な三次構造となることを許容する工程；

を包含する。

その後、必要に応じて、このペプチドは、2つ以上のモノマーが結合して、ダイマー形態または他のマルチマー形態のような単位を形成する四次構造であると推測することが可能

となり得る。その上、本発明は、さらに必要に応じて、本明細書中では活性ダイマー形態と呼ばれる、最も阻害活性の高い形態を得るために、ダイマー形態を分離する工程を包含する。

本発明の方法において有用な核酸配列は、配列番号：1およびその機能的等価物を含む。本明細書で用いられる用語「機能的等価物」とは、B7結合活性を有するポリペプチドをコードする配列の能力に実質的に影響しない上記配列に、一つ以上の付加、欠失、または置換を行った改変配列を意味する。このような改変配列は、当該分野では公知な方法（例えば、部位特異的突然変異誘発）により生成され得る。配列は、CTLA4レセプタータンパク質の細胞外ドメインをコードする天然のDNA配列のような天然源から得られ得る。あるいは、配列は、当該分野において公知な方法に従い、合成により生成され得る。さらに、このようなDNA配列は、合成および天然源の組み合わせ由来であり得る。天然の配列は、さらにcDNAおよびゲノムDNAセグメントを包含する。合成および天然のDNA配列を得る方法は、1993年1月7日公開のPCT公開公報第WO 93/00431号に記載されており、これは本明細書中に参考として援用されている。

これらの方法に用い得たベクターは、上記のように、CTLA4 DNA配列を挿入するベクターを包含する。本明細書で用いた用語「本質的に成る」とは、CTLA4レセプタータンパク質の細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むベクターを

意味し、そこにはあらゆる所望の作動可能なエレメントが含まれるが、ヒトIg分子をコードするヌクレオチド配列は含まれない。CTLA4 DNA配列は、挿入され得、そしてその発現に影響するあらゆる所望の作動可能なエレメントと連結され得る。ベクターは、以下の作動可能なエレメントを1つ以上含み得る：(1) プロ

モーター；(2) Shine-Dalgarno配列および開始コドン；(3) 終止コドン；(4) オペレーター；(5) 宿主細胞の外への移送を促進するリーダー配列；(6) 調節タンパク質の遺伝子；(7) ベクターの適切な転写およびそれに続く翻訳に必要なまたは好ましいあらゆる他のDNA配列。欧州特許出願第90 113 673.9号は、本明細書中に参考として援用されており、これはいくつかの有用なベクターおよび所望の作動可能なエレメントを開示している。

ベクターは、当該分野において公知な種々の方法（トランスフェクションおよび形質転換の手法を包含する）により適切な宿主細胞に移され得る。種々の転移方法が、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)に記載されており、これは本明細書中に参考として援用されている。このような宿主細胞は、真核細胞または原核細胞のいずれかである。このような宿主細胞の例には、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、酵母、E. coli、およびバキュロウイルス感染昆虫細胞が包含される。欧州特許出願第90 113 673.9号（本明細書中に参考として援用されている）に記載の宿主細胞もまた、本発明の方法に有用である。

本発明の宿主細胞は、組換えCTLA4ポリペプチドの発現に適切な条件下で培養され得る。これらの条件は、一般的に宿主細胞に特異的であり、そしてこのような細胞の成長条件についての出版された文献に照らして当業者により容易に決定される。例えば、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology、第8版、Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland（これは、本明細書中に参考として援用されている）には、細菌を培養するための適切な条件に関する情報が含まれている。酵母および哺乳動物細胞の培養に関する類似の情報が、R. Pollack, Mammalian Cell Culture, Cold Spring Harbor Laboratories (1975)（これは、本明細書中に参考として援用されている）に記載されている。

1つの実施態様では、細胞は、所望のCTLA4ポリペプチドの発現を阻害する適切な調節条件に直面する高い密度にまで増殖し得る。最適細胞密度に到達したとき、環境条件は、当該分野で公知の手順に従って、または以下の実施例に記載されるように、ポリペプチドの発現に適切な条件に改められ得る。従って、発現し

たCTLA4ポリペプチドを回収する前には、宿主細胞を発現を誘発する前に、最適密度の近くまで増殖させておくことが特に有用である。

組換えCTLA4ポリペプチドの発現は、例えばウエスタンブロッティング、またはELISAなどの当該分野において公知のアッセイ手順に従って、抗CTLA4抗体を用いることにより確認され得る。組換えポリペプチドの発現が一旦確認されると、次い

でポリペプチドは当業者に公知の方法に従って回収される。

組換えポリペプチドは、回収後に精製され得、そして必要であれば、精製前または後に組換えポリペプチドの活性構造を推測し得る。好ましくは、ポリペプチドはその活性三次構造または活性四次構造を推測する前に精製される。組換えタンパク質の精製方法は、当該分野において公知であり、そして、例えば、欧州特許出願第90 113 673.9号に記載の方法（これは、本明細書中に参考として援用される）を含む。

生物学的に不活性な形態またはその生物学的活性を増加させる形態で発現するポリペプチドについて、以下の一般的な再生手順が用いられ得る。これらの手順は、E. coliなどの原核宿主細胞により発現される生物学的に活性なポリペプチドを生成するのに特に有用である。

第1に、CTLA4ポリペプチドの発現中に生じる、分子内あるいは分子間のジスルフィド結合または他の非共有結合は、ポリペプチドを変性剤および還元剤にさらすことにより切断される。適切な変性剤は、分子間または分子内結合を切断することによりタンパク質のコンフォメーションに変化を生じ、その結果その一次構造に実質的な影響を与えることなく生物学的な活性を失わせる化合物または化学物質である。このような変性剤の例には、塩酸グアニジンおよび尿素が含まれる。

好ましくは、塩酸グアニジンが変性剤として用いられる。グアニジンの濃度は、約0.5M~約6.0Mの範囲、好ましくは、

少なくとも約6.0Mである。

尿素を変性剤として用いる場合、生じる得あらゆる妨害シアン酸塩は、尿素溶液をDOWEX 1-X8 (BioRad, Richmond, California) などのアニオン交換カラムにかけることにより除去され得る。従って、シアン酸塩は、タンパク質中のアミノ酸を改変し、そして除去され得る (Stark, Methods in Enzymology 11: 125 (1967))。

次に、ジスルフィド結合は、次いで還元剤で還元される。適切な還元剤には、例えば、 β -メルカプトエタノール、ジチオスレイトール (DTT) およびシステインが包含される。好ましくは、DTTが還元剤として用いられる。好ましいDTT濃度は、6 mMである。実施例5および8Aに記載の1つの実施態様では、還元されたタンパク質中に存在する遊離のチオールは、酸化剤、好ましくはジスルフィド含有酸化剤 (例えば、酸化グルタチオンまたはシスチン) を過剰に添加することにより酸化される。最後に、得られた溶液は、ジスルフィド互換を触媒する第2還元剤を添加する前に希釈される。好ましくは、第2還元剤は、スルフヒドリル (チオール) 基を含有する試薬であり、例えば、DTT、2-メルカプトエタノール、ジチオエリスリトール、システイン、シスタミンなどが挙げられる。第2還元剤はまた、ジスルフィド含有化合物であり得、例えばシスチン、酸化グルタチオンまたはあらゆるシステイン含有ペプチドが加えられた水素化ホウ素ナトリウムまたはあらゆるVIA族水素化物が挙げられる。第2還元剤を添加する目的は、種々のジ

スルフィドまたは他の非共有結合の形成および破碎により、CTLA4組換えポリペプチドの種々の三次元配置を推測する環境を作ることである。いかなる特定の理論にもしばられることを望まないが、野生型CTLA4レセプタータンパク質の適切な三次元構造およびジスルフィド結合パターンは、他の可能なコンフォメーションよりエネルギー的により安定であると考えられる。従って、組換えポリペプチドの種々の三次元配置をとり得る条件下で、ポリペプチドの比率が生物学的に活性なコンフォメーションを形成する。さらに、この環境はまた、分子間ジスルフィド結合を介してダイマーの形成を促進する。

2番目の好ましい方法では、変性および還元タンパク質は希釈され、そして実

施例8Bに記載の酸化または還元剤をさらに添加することなく、モノマーおよびダイマーへの再生を可能にする。

モノマーおよびダイマー形態は、次いで、以下の実施例5および8に記載の手順に従って分離され得る。簡単に言えば、混合物を最初に透析し、遠心分離する。この後得られた上清をイオン交換カラム、好ましくはアニオン交換カラムに通し、次いでサイジングカラム（例えばSuperdex 75カラム）に通す。イオン交換カラムの通過により、約70%がダイマーであるダイマープール混合物が得られ、サイジングカラムの通過により少なくとも90%のダイマー、好ましくは約95%のダイマーのダイマープール混合物が得られる。同じ手順で、少なくとも約85%のモノマーのモノマープール混合物が得られる。こ

の後、さらにダイマーからモノマーを分離するために、この混合物は、フェニルセファロースカラム、または代わりに逆相カラムに通され得る。有用なイオン交換カラムには、Mono Q、Q-Sepharose、Resource Q、およびSource 15Qカラムが含まれるがこれらに限定されない。当業者に公知の他の同等の分離手順もまた、種々の組換えCTLA4形態を分離するのに用いられ得る。

本発明はまた、組換えCTLA4ポリペプチドの機能的誘導体を提供する。本明細書中で用いられる用語「機能的誘導体」とは、組換えCTLA4ポリペプチドの任意の生物学的に活性な改変された形態を意味する。このような改変形態は、(1) アミノ酸配列での置換または付加、および/または、(2) 架橋剤として用いられ得るか、または特定の薬物動態学的特性または免疫学的特性を改良する別の官能基の付加であり得る。しかし、このような改変形態は、親組換えポリペプチドの生物学的活性を、活性の10倍以下に、好ましくは5倍未満に、実質的に低下させる。従って、本明細書中に用いられる用語「機能的誘導体」とは、非改変組換えCTLA4ポリペプチドの生物学的活性を実質的に保持する、上記の組換えCTLA4ポリペプチドの活性フラグメント、アナログ、または誘導体を意味する。アナログの場合、好ましいこのような改変ポリペプチドは、配列番号2に比較して約40%より大きい、より好ましくは50%より大きい、そして最も好ましくは90%より大きいアミノ酸相同性を有する。約99%のアミノ酸相同性が特に有用である。

例えば、1つの改変は、アミノ酸配列内に「遊離システイン」を提供するシステインの置換または付加であり得、これは「システイン変異タンパク質」を生成する。本明細書中で用いられる用語「システイン変異タンパク質」または「CTLA₄変異タンパク質」とは、分子内または分子間ジスルフィド結合に関係しない少なくとも1つのシステインを有する変異タンパク質をいう。遊離システインは、B7に結合するその能力を実質的に妨害しない任意のアミノ酸残基に現れ得る。好ましくは、システインは、N末端由来の配列番号2の残基番号79、80、81、109、110、111の残基にある少なくとも1つのアミノ酸と置換されるか、またはその残基番号125残基の後に付加される。

変異タンパク質または他の誘導体は、当業者に周知の方法により調製され得る。このような方法には、例えば、システインをコードするヌクレオチドに置換するかまたはこれを付加する突然変異誘発法が含まれる。一般的な方法は、例えば米国特許第4,518,584号に記載され、これは本明細書中に参考として援用されている。あるいは、変異タンパク質は、当業者に知られる方法によってもまた合成され得る。

1つの実施態様では、システイン変異タンパク質は、ポリエチレングリコール(PEG)に遊離システインで結合され得、その分子量を増大し、そしてその薬物動態動態学的特性(例えば血清半減期の増大)を改善する。PEGの長鎖ポリマー単位は、変異タンパク質上の遊離システイン残基のスルフヒドリル基

への共有結合により、変異タンパク質に結合され得る。異なる分子量を有する種々のPEGポリマーが用いられ得る。このようなPEGポリマーとしては、例えば、5.0kDa(PEG_{5,000})、8.5kDa(PEG_{8,500})、10kDa(PEG_{10,000})、および20kDa(PEG_{20,000})が用いられる。反応選択性および均質な反応混合物を得るために、スルフヒドリル基に特異的に反応する機能化ポリマー単位を用いることが有用である。長鎖PEGポリマーに結合した官能基または反応基は、変異タンパク質が遊離システイン部位で結合する活性基である。適切な活性基には、例えば、マレイミド、スルフヒドリル、チオール、トリフレート(triflate)、トレシレート(tresylate)、アジリジン(aziridine)、エキシラン(exirane)、または5-ピリジルが含ま

れる。PEG分子はまた、NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) 誘導PEG分子を用いてCTLA4に遊離アミン基で結合され得る。

他のCTLA4複合体もまた、例えば、(1) 1つのPEG分子をCTLA4モノマー (単PEG化された) またはダイマーに、例えば以下の実施例に記載のように遊離アミンで、結合することにより；(2) 2つのPEG分子をCTLA4ダイマーに結合することにより；または(3) 2つまたはそれ以上のCTLA4モノマーまたはダイマーをPEGのような架橋部分を介して結合させることにより、図式的に「ダンベル」として表され得る化合物を生成すると意図され得る。あるいは、2つまたはそれ以上のCTLA4ダイマーがPEGのような架橋部分を介して結合されて、「ダイマーダンベル」を生成し得る。

ダンベル化合物を作製するために、2つの活性基を含有するPEG分子が用いられ得る。このような分子としては、例えば、PEGビスマレイミド (分子の各末端にマレイミド活性基を含有するPEG分子) またはビス-NHS-PEG (分子の各末端にNHS基を含有するPEG分子) が挙げられる。当業者は、適切なpH、ポリペプチド濃度、および単PEG化されたポリペプチドまたはダンベルポリペプチドの有用な収量を得るのに必要なポリペプチド：PEG比を容易に決定し得る。

本発明は、さらに、薬学的に受容可能なキャリア中に組換えCTLA4ポリペプチドまたはその機能的誘導体を含有する薬学的組成物を提供する。本明細書中で用いられる用語「薬学的に受容可能なキャリア」とは、活性成分に対し非毒性の、一般的に不活性のベヒクルを意味し、その成分またはこの組成物が投与される被験体に悪影響を及ぼすことがない。適切なベヒクルまたはキャリアは、標準的な薬学テキスト、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 第16版、Mack Publishing Co., Easton, PA (1980) に記載されており、これは本明細書中に参考として援用されている。このようなキャリアには、例えば、炭酸水素バッファー、リン酸バッファー、リンガー液、および生理食塩水のような水溶液が含まれる。さらに、このキャリアは、処方物のpH、浸透圧重量モル濃度、粘度、透明度、色、無菌性、安定性、溶解速度、またはにおいを改良するかまたは維持するために、他の薬学的に受容可能な賦形剤を含み得る。

この薬学的組成物は、当該分野で公知の方法により調製され得る。この方法には、実施例の方法、単に試薬を混合する方法が含まれる。当業者は、目的とする使用および投与形態に依存する、薬学的キャリアの選択および組成物の適切な調製を理解している。

薬学的組成物はいったん処方されると、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固形物、または脱水したまたは凍結乾燥した粉末として、滅菌バイアル中に保存され得る。このような処方物は、そのまま使用可能な形態であるか、または投与前に再構成が必要な形態であるかのいずれかであり得る。一般的に、処方物の保存は、このような薬剤に従来用いられる温度で行われる。このような温度には、室温または好ましくは4℃またはそれ以下、例えば-70℃が含まれる。処方物は、約5から約8のpH範囲の間、好ましくはおよそ生理的pHで、保存および投与され得る。

組換えCTLA4ポリペプチドおよびそれらの機能的誘導体は、種々の目的に対して用いられ得る。1つの実施態様では、組換えポリペプチドは、当該分野で公知の方法に従って、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を生成するための免疫原として用いられ得る。この方法には、例えば、HarlowおよびLane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988)に記載の方法があり、これは本明細書中に参考として援用されている。CTLA4は免疫抑制性であるので、好ましくは、組換えCTLA4ポリペプチドは、最初に変性し、そして所望であれば免疫原と

して使用する前に還元して抗CTLA4抗体を生成する。このような抗体は、順に、当該分野で周知の手順に従って、T細胞の細胞表面上のCTLA4レセプタータンパク質の検出、またはイメージングのようなインビボ使用、またはB7のこのようなレセプタータンパク質への結合の阻害のために用いられ得る。

本発明の組換えポリペプチドはまた、当該分野で公知の手順に従って、B7または精製B7の存在を検出するための検出試薬として用いられ得る。診断目的では、組換えポリペプチドは、検出されるべきリガンドを含むと考えられる試料にさらす前にマーカーで標識され得る。このポリペプチドはまた、B7の精製のために、固体支持体に結合され得る。

さらに、組換えポリペプチドおよびそれらの機能的誘導体は、不適切なT細胞活性化および増殖に関連した疾患を予防、抑止、または治療するのに用いられ得る。従って、本発明は、有害なT細胞活性化および増殖に関連した疾患の治療方法を提供する。このような疾患には、例えば、移植拒絶、種々の自己免疫疾患、および他のT細胞介在疾患が含まれる。PCT公開番号WO 93/00431（本明細書中に参考として援用されている）は、種々のT細胞介在疾患を記載している。CTLA4ポリペプチドおよびその機能的誘導体の投与が有用であり得る自己免疫疾患には、E. RubensteinおよびD. Federman, Scientific American Medicine, 第2巻, IV章（1993）（これは、本明細書中に参考として援用されている）に記載される、関節リウマチ、喘息、狼瘡、多発性硬化症、乾癬、対宿主性移植片病、

I型糖尿病、および他の自己免疫疾患が含まれる。

本発明の治療方法は、有害なT細胞活性化を阻害するのに有効な量の本発明の組換えCTLA4ポリペプチドまたはそれらの機能的誘導体を被験体に投与することにより達成される。活性成分は、好ましくは、前記のようにして薬学的組成物中に処方される。

本明細書で用いられる用語「被験体」とは、B7により共刺激され得るT細胞を有するいずれもの動物をいい、これにはヒトも含まれる。さらに、組換えCTLA4ポリペプチドおよびそれらの機能的誘導体もまた「活性成分」とも呼ばれる。

有効投与量は当業者に公知の種々の要因に依存し、これらの要因には、被験体の種類、年齢、体重、および医学的状态、ならびに予防、抑止、または治療されるべき疾患のタイプ、症状の重篤さ、投与経路、および用いられる活性成分が含まれる。熟練した医師または獣医は、活性成分の有効量を容易に決定し指示し得る。一般的には、治療は、活性成分の最適用量より実質的に少ないような少量で開始され得る。この後、投与量は、顕著な弊害または有害な副効果を引き起こすことなく最適または所望の効果が得られるまで、少量ずつ増加させる。好ましくは、1日当たりの投与量は、ヒト被験体あたり約10~約2000mgの範囲内である。

本発明の化合物および薬学的組成物は、経口投与または当該分野で公知の任意の手段による非経口投与により投与され得る。このような投与には、例えば、静

脈内、皮下、関節内、

または筋肉内の注射または注入が含まれる。所望の有効用量を達成し維持するために、繰り返し投与が望ましいと。投与の頻度は、いくつかの要因に依存する。このような要因としては、例えば、用いられる処方物、疾患のタイプ、被験体の個体特性などが挙げられる。当業者は、このような要因に基づいて適切な頻度を容易に決定し得る。

以下の実施例は、本発明の説明するものであって、制限するものでないことが意図される。

実施例 1

CTLA4のクローニング

CTLA4タンパク質の細胞外ドメインをコードするDNA配列をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技法を用いて、ヒトT細胞白血病細胞株「Hut 78」から、クローンした。Hut 78細胞株 (カタログ# TIB 161) は、メリーランド州、ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手した。このHut 78細胞を、10%ウシ胎児血清、2mMグルタミン、 5×10^{-5} M2-メルカプトエタノール、100U/ml ペニシリン、および100 μ g/ml ストレプトマイシンを含むRPMI1640培地中、 4×10^6 細胞/mlで培養した。この細胞に、5 ng/mlホルボール12-ミリステート13-アセテート (カタログ# P-8139, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)、1 μ g/ml PHA-L (カタログ# L-4144, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)、5 ng/ml

IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) を添加して活性化し、さらに49時間培養した。回収に際し、 9×10^6 個の細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で洗浄し、ペレットにして液体窒素中で速やかに凍結し、そして一晩 -70°C で保存した。次の日、この凍結細胞を3 mlのPBS中に再懸濁し、その1 ml (3×10^6 細胞) を簡単に微量遠心にてペレットにした。Invitrogen Corporation (San Diego, CA) から購入した「Micro FastTrack mRNA Isolation Kit」を製造者の提供した取扱説明書に従って使用して、メッセンジャーRNAを上記細胞から調製した。得られ

たmRNAペレットを $10\mu\text{l}$ の水に再懸濁し、その $1\mu\text{l}$ を、「cDNA Cycle Kit」(Invitrogen Corporation) および該キットで供給されたランダムプライマーを用いる、第1鎖のcDNA合成に使用した。この第1鎖のcDNA合成手法は、製造者の取扱説明書に従って、実施した。

成熟CTLA-4 (Dariavachら、Eur. J. Immunol., vol.18, 1901-1905頁 (1988)) のcDNA細胞外部分 (アラニン1からアスパラギン酸125まで) を、 $100\mu\text{l}$ の容量中、 10mM Tris (pH8.3)、 50mM KCl、 1.5mM MgCl_2 、 0.001% (w/v) ゼラチン、各々 $200\mu\text{M}$ のdATP、dCTP、dGTPおよびTTP、ならびに各々20ピコモルのオリゴヌクレオチドプライマー、 $5'\text{CCCCATATGGCAATGCACGTGGCCCGCCTGCT3'}$ (配列番号:3) および $5'\text{CCCAAGCTTGGTACCTTATCAGTCAGAATCTGGGCACGGTTCTGG3'}$ (配列番号:4) (CTLA-4のDNA配列と重複する領域には、下線を付している。) を含有する混合物中における、上記第1鎖のcDNAから成る全cDNA容量の5

分の1 ($20\mu\text{l}$ のうちの $4\mu\text{l}$) を用いたPCR法により、増幅した。 95°C 、1分間のRNA/cDNAハイブリッドの変性後、温度を 600°C に下げ、そして $0.5\mu\text{l}$ (2.5単位) の「AmpliTaq DNA Polymerase」(Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT) を加え、そして温度を 72°C に上げた (1分間)。PCR法は、Ericomp製「TwinBlock」サーマルサイクラー (San Diego, CA) において、 95°C 1分間、 600°C 1分間、および 72°C 1分間を包含する29回の付加工程により実施した。このPCR増幅は、 72°C での10分間のインキュベーションにより終了とした。

0.4kb のPCRフラグメントが生成されていることを (1.5% アガロースゲル上での少量の反応混合物の泳動により) 確認後、反応混合物をフェノールで1回抽出し、次いでエタノールで沈澱し、続いて制限エンドヌクレアーゼNdeIおよびHindIIIにより切断した。切断されたDNAをスピンカラムにかけて小さいDNAフラグメントを除去した。そして、その少量 (元のPCR反応物の約20分の1) をNdeIおよびHindIIIで切断されたpT88IQ (Tacプロモーター発現プラスミド) に連結し、E.coliの宿主株「DH5- α 」 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MDから入手可能) に挿入した。

発現ベクターpT88IQは、発現ベクターpT3XI-2からの派生物である。このベク

ターpT3XI-2は、以下の方法で構築された。この構築のための開始プラスミドは、Pharmaciaから購入したプラスミドpKK223-3である。プラスミドpKK223-3は、テトラサイクリン耐性遺伝子の一部を保有している。機能を有さな

いこの遺伝子を、プラスミドpBR322中に保有される完全なテトラサイクリン耐性遺伝子で置換した。プラスミドpKK223-3をSphIで完全に切断し、そしてBamHIで不完全に切断した。4.4キロベースペアのフラグメントをゲルで精製し、以下の合成アダプター（配列番号:5）：

```

5'   GATCTAGAATTGTCATGTTTGACAGCTTATCAT   3'
3'   _____ATCTTAACAGTACAACTGTCGAATAGTAGC   5'
      BglII                               ClaI

```

および上記pBR322 (PL Biochemicals, 27-4891-01) のテトラサイクリン耐性遺伝子のClaI、SphI切断から得たDNAの539ベースペアのフラグメントを結合した。得られたプラスミドをpCJ1と命名した。

次に、New England Biolabs (Beverly, Massachusetts) から購入したXhoIリンカーをプラスミドpCJ1のPvuII部位に挿入し、pCJX-1を形成した。この挿入は、プラスミドコピー数を制御するrop遺伝子を破壊する。次に、lacI遺伝子を含むEcoRIフラグメントをプラスミドpMC9 (Calosら、(1983)) から精製し、そして、XhoI~EcoRIのアダプターとともに、XhoI部位へ挿入した。次に、pKK223-3のポリリンカー領域をEcoRIおよびPstIでの切断により、付加部位を含むポリリンカー（配列番号:6）：

```

5'   AATTCCCGGG TACCAGATCT GAGCTCACTA GTCTGCA   3'
3'   GGGCCC ATGGTCTAGA CTCGAGTGAT CAG   5'

```

で置換した。こうして得られたプラスミドベクターをpCJXI-1と命名した。

最後に、上記テトラサイクリン耐性遺伝子を、制限酵素HindIII、BamHI、およびSalIの認識部位が亜硫酸水素塩突然変異誘発により破壊された同等の遺伝子で置換した。以下の手法を、pBR322のテトラサイクリン耐性遺伝子を変異させるのに用いた。プラスミドpBR322をHindIIIで切断し、次いで、亜硫酸水素ナトリウ

ムで変異誘発した (Shortle and Botstein, 1983)。変異したDNAを連結し、環状DNAを形成した。次いで、HindIIIで切断し、変異を免れたプラスミドを全て直線化した。この切断反応混合物を用いてE.coli JM109 (Yanisch-Perronら、1985) を形質転換した。テトラサイクリン耐性コロニーを単離し、そして上記プラスミドのテトラサイクリン耐性遺伝子中のHindIII部位の欠失を調べた。うまく変異したプラスミドをpT1と命名した。同様の手法により、pT1のBamHI部位の変異についても行い、プラスミドpT2を得た。次に、プラスミドpT2を変異誘発してSalI部位を除去し、プラスミドpT3を形成した。変異したテトラサイクリン耐性遺伝子を保有する、pT3のClaI-StyIフラグメントを単離し、これを用いて、pCJXI-1の相同フラグメントを置換し、pT3XI-2を形成した。この変異したテトラサイクリン耐性遺伝子は、依然、機能性タンパク質をコードする。tacプロモーター領域の下流に、ポリリンカーを導入した。これは、以下に示すように、E.coliでの発現のための遺伝子クローニングの際に有用な、BamHIおよび

KpnI認識部位を他の部位の間に含有している。

pT3XI-2と同様、pT88IQが含有するクローンされた遺伝子の発現は、tacプロモーターにより制御される。翻訳は、唯一つのNdeI認識配列CATATG中のATGから開始される（下流のNdeI部位は除去され、その結果、この開始部位のNdeI配列が唯一となる）。このNdeI部位の下流にポリリンカーがあり、所望の遺伝子の挿入を助長する。さらに、IacI領域を含有する上記XhoIフラグメントを、lacZプロモーターおよびそのオペレーター（lacリプレッサーの結合部位である）が除かれた欠損フラグメントで置換した。上記置換したlacI領域はまた、lacIQ変異（一つの塩基の置換によりlacリプレッサーの生産が増大したもの：Muller-Hillら、Proc. Nat'l Acad. Sci. (U.S.A.) 59:1259-1264 (1968)）を保有する。

pT3XI-2とpT88IQとの特有の差異は以下の通りである。

1. クローニング部位の領域

上記ポリリンカーの上流のEcoRI部位と、上記ポリリンカーの下流のHindIII部位との間の、以下の135マーの配列が置換されている（配列番号:7）：

5' >CACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTCTTTAACTTTAAGAAGGAGATATA
CATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCCCGGGTACCGTCGA
CGAGCTCTTCGAACTAGTCCGCGGT > 3'

この配列は、発現のための開始コドンのNdeI部位（下線部）、

ならびにBamHI、XmaI、KpnI、SalI、SacI、BstBI、SpeI、およびSacIIを含むポリリンカーを含有する。

2. NdeI部位の下流

pT3XI-2のクローニング領域の下流約2.4Kb付近にNdeI部位が存在する。pT88IQにおいては、この部位が除去され、その結果、上述したように、開始コドンでのNdeI部位が唯一である。この部位は、5' > CATATG > 3' から5' > CATATATG > 3' に変えられていて、NdeI認識配列が除去されている。

3. lacIq領域

pT3XI-2の二つのXhoI部位間にある、lacI領域を含有するこの領域は、以下に示す1230塩基配列により置換されている：

pT88IQのlacIq配列 (1230bp) (配列番号：8)

```

CCATGGCTGG TGCCTAATGA GTGAGCTAAC TCACATTAAT TGCCTTGGCG
TCACTGCCCCG CTTTCCAGTC GGGAAACCTG TCGTGCCAGC TGCATTAATG
AATCGGCCAA CGCGCGGGGA GAGGCGGTTT GCGTATTGGG CGCCAGGGTG
GTTTTTCTTT TCACCAGTGA GACGGGCAAC AGCTGATTGC CCTTCACCGC
CTGGCCCTGA GAGAGTTGCA GCAAGCGGTC CACGCTGGTT TGCCCCAGCA
GGCGAAAATC CTGTTTGATG GTGGTTGACG GCGGGATATA ACATGAGCTG
TCTTCGGTAT CGTCGTATCC CACTACCGAG ATATCCGCAC CAACGCGCAG
CCCGGACTCG GTAATGGCGC GCATTGCGCC CAGCGCCATC TGATCGTTGG
CAACCAGCAT CGCAGTGGGA ACGATGCCCT CATTGAGCAT TTGCATGGTT
TGTTGAAAAC CGGACATGGC ACTCCAGTCG CCTTCCCGTT CCGCTATCGG
CTGAATTTGA TTGCGAGTGA GATATTTATG CCAGCCAGCC AGACGCGAGC
GCGCCGAGAC AGAACTTAAT GGGCCCGCTA ACAGCGCGAT TTGCTGGTGA
CCCAATGCGA CCAGATGCTC CACGCCAGT CCGGTACCGT CTTGATGGGA
GAAAATAATA CTGTTGATGG GTGTCTGGTC AGAGACATCA AGAAATAACG
CCGGAACATT AGTGCAGGCA GCTTCCACAG CAATGGCATC CTGGTCATCC
AGCGGATAGT TAATGATCAG CCCACTGACG CGTTGCGCGA GAAGATTGTG
CACCGCCGCT TTACAGGCTT CGACGCCGCT TCGTTCTACC ATCGACACCA
CCACGCTGGC ACCCAGTTGA TCGGCGCGAG ATTTAATCGC CGCGACAATT
TGCGACGGCG CGTGCAGGCG CAGACTGGAG GTGGCAACGC CAATCAGCAA
CGACTGTTTG CCCGCCAGTT GTTGTGCCAC GCGGTTGGGA ATGTAATTCA
GCTCCGCCAT CGCCGCTTCC ACTTTTTCCC GCGTTTTCGC AGAAACGTGG
CTGGCCTGGT TCACCACGCG GGAAACGGTC TGATAAGAGA CACCGGCATA
CTCTGCGACA TCGTATAACG TTA CTGGTTT CACATTGACC ACCCTGAATT
GACTCTCTTC CGGGCGCTAT CATGCCATAC CGCGAAAGGT TTTGCACCAT
TCGATGGTGT CGGAATTAAT TCAGCCATGG

```

この置換された領域は、*lacZ*プロモーターおよびオペレーター領域（*lacI*プレッサーの結合領域である）が除外されている。この領域はまた、*lacI*プレッサーを合成を増大させる *lacIq*変異を含有する（Muller-Hillら、同上）。

プラスミドDNAを種々の得られた上記コロニーから調製し、挿入DNAを配列解析した。予期される配列の種々のクローンが見いだされ、発現試験により、それらが予期されるサイズのsCTLA-4（約14kDa）組換えタンパク質を産生することが認められた。

発現レベルを高めるために、NdeIおよびKpnIにより、クローン59-8-7のsCTLA-4領域を切り出し、アガロースゲルから溶出して、pT88IQプラスミドから単離精製した。次いで、PCT特許公開公報第WO 91/08285号（本明細書中に参考として援

用されている)に記載される様に、同様に切断したT7プロモーター発現ベクター pT5Tに連結した。このpT5T::sCTLA4構築物をE.coliの宿主株HMS174/DE3 (Brookhaven National Laboratory, Upton, NYのF. William Studier博士から入手した)に挿入した。このプラスミドDNAは、3コロニーから調製した。このプラスミドDNAを配列解析して、正しいsCTLA4 DNA配列が、正しく挿入されていることを確認した。一つのクローン、59-8-14が、発現および再生 (refolding) の研究のために選択され、以下これをpT5T::sCTLA-4という。本研究において得られた全てのCTLA4 cDNAは、そのタンパク質の配列 (配列番号: 2) の第111位のアミノ酸としてスレオニン残基を含有するが、ア

ラニン残基は含まなかった。この結果は、Linsleyら、J. Exp. Med. 174:561-569 (1991) により報告された、ヒトCTLA4の正確なヌクレオチド配列を裏づける。

上記sCTLA4タンパク質の予備的発現は、pT5T::sCTLA-4を含むHMS174/DE3を12 μ g/mlテトラサイクリンを含有するLプロス中で、OD₆₀₀が1.0になるまで培養することにより、実施した。このとき、sCTLA-4の発現は、イソプロピル β -Dチオガラクトピラノシド (IPTG、カタログ#I-5502、Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) を1 mMの濃度まで添加することにより誘導した。細胞は、誘導後2時間で回収した。全細胞のうちの少量を5%の2-メルカプトエタノールを含有するSDS試料バッファー中で2分間ボイルし、そして14%ポリアクリルアミドSDSゲルで泳動した。クマシーブルーで染色して可視化したゲルの最も主要なバンドがおよそ14kDaのsCTLA-4であった。異なる遺伝子 (インターロイキン-6) を有するpT5Tを含有するHMS174/DE3から調製したコントロール培養物の溶解物においては、上記バンドは存在しなかった。

実施例 2

sCTLA4の大容量生産

10リットルの発酵を、生化学分析に十分な量の組換えsCTLA4を提供するために行った。プラスミドpT5T::sCTLA4を含むE.coliのHMS174/DE3株を、A660での光学密度が10になるまで、10Lの複合培地 (40g/L NZ-アミンHD、4 g/L KH₂PO₄、1 g

/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 g/L Na_2SO_4 、0.3g/L Na_3 ケン酸 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、50g/L グリセロール、10mg/L チアミンHCl、2 ml/L 微量鉱物、0.05ml/L Mazu DF-204、および15mg/L テトラサイクリン) 中で37℃で培養した。このとき、培養物に0.24グラムのIPTG (0.1mMの最終濃度) を加えることにより、細胞を誘導した。この細胞をさらに6.5時間培養し、次いで遠心分離により回収した。この細胞ペレットを使用するまで-20℃で凍結保存した。

実施例 3

洗浄した封入体 (WIBS) の調製

実施例 2 に従って調製した403グラム湿重量のE.coliの細胞ペレットを、2 リットルの破碎バッファー (25mM NaCl、50mM Tris-HCl pH 7.5、1mM ジチオスレイトール) で希釈した。得られたスラリーを10,000PSIの圧力で3回Rannieミニミル (APV Gaulin, Inc., Everett, MA) に通して、細胞を破碎した。破碎した細胞を、Beckman J2-20遠心機のJA-10ローターを用いて5,000rpmで15分間回転させた。上清をデカントし、捨てた。ゆるい (loose) ペレットを破碎バッファー中に再懸濁し、そして10,000rpmで60分間再度回転させ、上清をデカントした。2相のペレットが観察された：下方のペレットは白色であり、ゆるい上方のペレットはベージュ色であった。このペレットを-20℃で凍結した。2つのペレットからの試料のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動

(SDS-PAGE) 分析により、sCTLA-4の大部分は下方の白色のペレット中に存在し、そして上方のベージュ色のペレットは主としてE.coliの膜タンパク質から構成されることが示された。

E.coli膜タンパク質を除去するために、実施例 2 の凍結ペレットを融解し、Polytron PT 3000ミキサー (Kinematica AG, Littau, Switzerland) を用いて8000 rpmでホモジナイズすることにより、1.5リットルの破碎バッファー中に再懸濁した。次いで、この混合物をJA-10ローター中で8000rpm (11,000×g) で30分間回転させた。このペレットを-20℃で凍結した。翌日、このペレットを融解し、(Polytronミキサーを用いて5000rpmでホモジナイズすることにより) 2.1リットルの破碎バッファー中に再懸濁し、前回と同様に8000rpmで遠心分離した。容器を

デカントして、残っているペーヅ色の膜の層の大部分を取り除き、これを捨てた。残りのペレットを、洗浄した封入体 (WIBS) と称する。洗浄した封入体の湿重量は92.5グラムであった。これは、元のE.coli細胞ペレットの重量の約23%である。WIBSを使用するまで-20℃で凍結した。

実施例 4

WIBS由来のsCTLA4の再折り畳みおよびインビトロ活性

1 グラムのWIBSを、60mlの新しく作成した6 MグアニジンHCl、0.1M Tris pH 8.0、6mMジチオスレイトール中で、Polytronミキサーを用いて2000~3000rpmで手早くホモジナイズして室温で15分間放置することにより変性させた。JA-20ロー

ターで18,000rpmにて15分間回転させることにより、不溶性デブリをペレットにした。3.3mlの0.5Mグルタチオンを上清に加えて、室温で15分間放置した。以下の溶液を、引き続いて室温で攪拌しながら加えた：

- 1) 40mlの、50mM Tris-HCl, pH 9.7中の6 Mグアニジン
- 2) 500mlの50mM Tris-HCl, pH 9.7
- 3) 6 mlの0.5Mシステイン
- 4) 6 mlの100mMフェニルメタンスルホニルフルオリド
(100% エタノール中)

再折り畳み混合物中のグアニジン-HClの好ましい濃度は、0.6Mと4 Mとの間であることが測定された。

sCTLA4の再折り畳み混合物を含む容器を4℃で2日間放置し、sCTLA4を適切なコンフォメーションに再折り畳みさせた。このとき、50mlの再折り畳み混合物を取り出し、生物学的活性をテストした。テストする前、再折り畳み混合物を、12-21遠心機 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) のJA-20ローターで8,000rpmにて15分間遠心分離して、再折り畳み手順の間に形成された全ての沈澱物を取り除いた。次いで、25mlの上清を4リットルの50mM NaCl、20mM Tris-HCl、pH 8に対して透析した。50mM NaCl、20mM Tris-HCl pH 8中の300ug/mlの濃度の10mlのヒト血清アルブミン (HSA) を同じフラスコ中で透析した。HSAはICN Pharmaceuticals, Inc. (Costa Mesa, CA, カタログ番号823011) から得た。透析後、再折

り畳み混合物およびHSA溶液をJA-20ローターで8,000rpmにて15分間遠

心分離して、沈澱した物質を除去した。透析したsCTLA4再折り畳み混合物およびHSAのタンパク質濃度は、それぞれ、750ug/mlおよび220ug/mlであることが測定された。

透析したsCTLA4再折り畳み混合物を、インビトロ混合リンパ球反応における生物学的活性についてテストした (Methods in Immunology, 487-497頁, J. S. Garvey, N. E. Cremer, およびD. H. Sussdorf編, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Reading, MA, 1977を参照)。このアッセイにおいては、2つの異なる個体からのリンパ球を混合する。それらの抗原性の差のために、これらの細胞は互いを異物として認識する。これによりリンパ球増殖を生じる免疫応答が開始される。細胞の増殖応答は、本明細書に記載の標準混合リンパ球反応手順に従って、細胞を³H-チミジンでパルスすることにより測定する。

リンパ球を、Sigma Diagnostics, St. Louis, MOから購入したAccuspin-System Histopaque 1077培地を用いてヒト被験体AおよびBから得た、抗凝血処理した血液 (エンドトキシンを含まない0.9%生理食塩水溶液中で作成された1/10容量の3.8%クエン酸ナトリウムで処理した) から単離した。以下の細胞単離手順は、このキットに付随する製造者の指示書に記載されているものであった。個体B由来のリンパ球を25ug/mlの濃度のマイトマイシンC (Sigma Chemical Company, St. Louis, MOから得た) で、30分間37℃で処理した。この細胞を10mlの培地で4回洗浄して、マイトマイシンCを除去した。

各個体からのリンパ球を完全培地 (25mM HEPESバッファー、10%ヒトAB血清、2mMグルタミン、100U/mlペニシリン、および100ug/mlストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地) 中に 1×10^6 /mlで再懸濁した。2つのリンパ球集団を混合した場合、96ウェル組織培養プレート (Corning Glass Works, Corning, NY) のウェルあたり100 μ lの各細胞懸濁液を加えた。非刺激リンパ球の増殖を測定するために用いたコントロールウェルは、200 μ lの単一の個体由来の細胞を含んでいた。透析した分画していないsCTLA4再折り畳み混合物またはHSAのアリコート、完全

培地中に $0.05 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ の濃度で懸濁した。懸濁液の $50 \mu\text{l}$ アリコートをし、混合した細胞集団の適切なウェルに加えた。試料を3回テストした。 37°C で5日間インキュベーションした後、各ウェルに、 $50 \mu\text{l}$ の完全培地中の $2 \mu\text{Ci}$ の ^3H -チミジン (Dupont、カタログ番号NET-0272) を入れた。約18~20時間後、細胞をPHDセルハーベスターを用いてガラス繊維フィルターストリップ上に (両方ともCambri dge Technology, Inc., Watertown, MAから購入した) 回収した。細胞をPBSで3回洗浄し、7%トリクロロ酢酸を用いてDNAを沈澱させた。フィルターを無水メタノールで洗浄して風乾した。DNA中に取り込まれた ^3H -チミジンを、シンチレーションカウントにより測定した。3連のウェルの平均を各テスト試料について計算した。

この実験の結果を表1に示す。データは、DNAへの ^3H -チミジンの取り込みの減少により測定されるように、sCTLA4の再

折り畳み混合物がリンパ球増殖の用量依存性阻害を引き起こすことを示す。観察された最大阻害は、 $10 \mu\text{g/ml}$ のタンパク質濃度で85%であった。50%阻害を与えた再折り畳み混合物のタンパク質濃度は、約 100ng/ml であった。HSAは同様のリンパ球増殖の阻害を引き起こさず、このことにより、sCTLA4再折り畳み混合物で観察された阻害は特異的であることが示された。

表 1

分画していないsCTLA-4再折り畳み混合物による混合リンパ球
反応（ヒト被験体 A および B）におけるリンパ球増殖の阻害

用量 (ng/ml)	再折り畳み混合物		HSA	
	cpm*	阻害 % **	cpm*	阻害 % **
0	3535	0%	3036	0
10	2746	29%	3382	-17%
100	2153	51%	3694	-33%
1,000	1703	67%	3400	-18%
10,000	1237	85%	2953	4%

* 1分あたりのカウント。3連のウェルの平均。

** まず、cpmの合計から同数の被験体 A および B の非混合細胞についてのcpmを差し引いた後、阻害パーセントを決定した。これらの「非刺激細胞」のcpmの合計は、sCTLA-4再折り畳み混合物およびHSAについてそれぞれ816および1021であった。負の阻害パーセントは刺激を示す。

実施例 5

sCTLA4モノマーおよびダイマーの精製および生物学的活性

A. 精製

実施例 4 に記載のように調製した300mlの再折り畳み混合物を、SPECTRO/POR 3 チューブ (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA) で5700mlの20mM Tris-HCl pH 8.0に対して4℃で一晩透析した。透析後、大量の沈殿物が観察された。SDS-PAGE分析により、沈殿物が主にE.coli膜タンパク質および不適切に再折り畳みされたsCTLA-4から構成されることが示された。透析した再折り畳み混合物を、JA-10ローター中で8000rpmにて15分間遠心分離した。上清を0.45ミクロンフィルター (Nalge Company, Rochester, NY) に通して残りの沈殿物を除去し、そして20mlのQ-セファロースカラム (Pharmacia LKB, Picataway, NJ) にかけて、50mMグアニジン、20mM Tris-HCl pH 8.0で洗浄した。結合したタンパク質を、60

0mlの0から60%までの1 M NaCl、20mM Tris pH 8.0の直線塩グラジエントで、流速5 ml/分にて溶出した。sCTLA4のモノマー形態は約250mM NaClで溶出したが（ピークA）、sCTLA4のダイマー形態は約350mM NaClで溶出した（ピークB）。約450~600mM NaClで溶出する広いタンパク質のピーク（ピークC）もsCTLA4を含んでいた。このピークは、主としてsCTLA4のモノマーと、ジスルフィド架橋されていると思われるsCTLA4のいくつかの高分子量形態から構成されていた。この物質は凝集し

たsCTLA4形態を示し得る。sCTLA4のモノマーおよびダイマー形態を、非還元条件下で14%ポリアクリルアミドSDSゲル上でカラム画分の試料を電気泳動することにより確認した。sCTLA4のダイマー形態は24~27kDaの分子量範囲で2つ~3つのバンドとして移動した。sCTLA4のモノマー形態は、14~16kDaの分子量範囲で2つ~3つのバンドとして移動した。ジスルフィド還元剤（2-メルカプトエタノール）の存在下で、ダイマーおよびモノマーの両sCTLA4は、約15kDaの相対分子量の単一バンドとして移動した。これらのゲル分析により、sCTLA4ダイマーは、ジスルフィド結合により互いに共有結合した2つのsCTLA4タンパク質を含むことが示された。

sCTLA-4のピークA、B、およびCを含むカラム画分を別々にプールし、攪拌細胞濃縮器およびYM3メンブレン（いずれもAmicon, Inc., Beverly, MAから得た）を用いて濃縮した。プールAおよびBを約1.9mlにまで濃縮し、プールCを約2.3mlにまで濃縮した。濃縮したプール中のタンパク質濃度は、プールAおよびBについては約900ug/mlであり、プールCについては1820ug/mlであった。1.5mlの各濃縮プールを、マルチウェル透析マニフォールド (manifold) (BRL, Gaithersburg, MD) で、2リットルの100mM NaCl、20mM Tris-HCl pH 7.4に対して1分あたり2.2mlで4℃で透析した。濃縮し、透析したプールのアリコート为非還元SDSゲルで試験した。プールAが大部分のsCTLA4モノマーおよび少量のsCTLA4ダイマーを含み；プールBが大部分のsCTLA4ダイマーおよび少量のsCTLA4モノ

マーを含み；そしてプールCが大部分のsCTLA4モノマーを含むがいくらか（約10

%) のsCTLA4ダイマーおよび少量の高分子量形態のsCTLA-4 (おそらく、トリマー、テトラマーなどである) も含むことが観察された。各プールの5つの $200\mu\text{l}$ のアリコートを凍結し、アッセイに使用するまで -70°C で保存した。

Q-セファロースカラムからのモノマーおよびダイマーのプール (それぞれプールAおよびB) のアリコート ($50\mu\text{l}$) を別々に、 250mM NaCl、 20mM 酢酸ナトリウム pH 5.5で平衡化したスーパーデックス-75サイズ分離カラム ($3.2\times 300\text{mm}$; Pharmacia LKB, Piscataway, NJから商業的に入手可能) にかけた。カラムを $50\mu\text{l}$ /分の流速で溶出した。モノマープールは $15\sim 17\text{kDa}$ の分子量を有する主要ピーク (総タンパク質の70%) として、および $30\sim 35\text{kDa}$ の分子量を有するマイナーピーク (総タンパク質の30%) として溶出した。ダイマープールは、 $30\sim 35\text{kDa}$ の分子量を有する主要ピーク (総タンパク質の70%) として、および $15\sim 17\text{kDa}$ の分子量を有するマイナーピーク (総タンパク質の30%) として溶出した。

B. CTLA4ダイマーの疎水性相互作用クロマトグラフィー

Q-セファロースカラムから得た $60\mu\text{l}$ のCTLA4ダイマープール (約 1.2mg/ml) を、 20mM Tris-HCl、 2M NaCl、pH 7.4で $500\mu\text{l}$ にまで希釈し、予め 20mM Tris-HCl、 2M NaCl、pH 7.4で平衡化したフェニルセファロース (Hi Sub) (Pharmacia/LKB, Piscataway NJ) を充填した 1ml のカラムにかけた。タン

パク質を $0\sim 50\%\text{CH}_3\text{CN}$ (および $2\text{M}\sim 0\text{M}$ NaCl) の直線グラジエントで 1.0ml /分の流速にて30分で溶出した。sCTLA4ダイマーは、約 $27\%\text{CH}_3\text{CN}$ 、 0.9M NaClで対称的なピークとして溶出した。sCTLA4モノマーは、約 $30\sim 35\%\text{CH}_3\text{CN}$ 、 0.8M NaClでわずかに遅れて溶出した。

C. CTLA4の逆相精製

Q-セファロースモノマー (プールA) およびダイマー (プールB) の $20\mu\text{l}$ アリコートを (H_2O 中の $0.05\%\text{TFA}$ で) $200\mu\text{l}$ にまで希釈し、予め H_2O 中の $0.05\%\text{TFA}$ で平衡化したRP-1逆相カラム (SynChrom Inc.) に別々にかけた。タンパク質を $0\sim 100\%\text{CH}_3\text{CN}$ ($0.05\%\text{TFA}$) の直線グラジエントで $100\mu\text{l}$ /分にて30分で溶出した。sCTLA4のモノマー形態は、約 $85\%\text{CH}_3\text{CN}$ で単一ピーク (約95%の純度) として溶出した。sCTLA4のダイマー形態は、約 $85\sim 90\%\text{CH}_3\text{CN}$ で5つ~6つの異種の

ピークとして溶出した。

HPLCカラムから得られたCTLA4モノマーおよびダイマーを当業者に公知のEdman分解方法により配列決定した。モノマーおよびダイマーについて得られたアミノ末端配列は同一であった：AlaMetHisValAla (配列番号9)。この配列はN-末端のメチオニン残基がないことを除いて、sCTLA4について予想されたアミノ末端配列に適合した。N-末端のメチオニン残基がないことは、この残基がE.coliプロセッサーによりsCTLA4タンパク質から効率的に開裂されることを示す。

実施例 6

組換え sCTLA4モノマーおよびダイマーのインビトロの活性

混合リンパ球反応での生物学的活性について、実施例5に記載のQ-セファロースカラムから得たプールA、B、およびCのアリコート进行测试した（実施例4に記載の方法）。この実験に用いたリンパ球をヒト被験体CおよびDから単離した。被験体Dに由来するリンパ球をマイトマイシンCで処理し、実施例4に記載のように洗浄した。混合リンパ球培養物を、実施例4に記載のように作製した。ヒト血清アルブミン (HSA) をコントロールタンパク質として用いた。この実験のためのHSAを、4mgのHSAを60mlの20mM Tris-HCl (pH8)、250mM NaCl、37.5mM グアニジン塩酸中で混合し、攪拌細胞濃縮器およびYM3メンブラン（いずれもAmicon, Inc., Beverly, MAから入手）を用いて試料を1.97mlまで濃縮することにより調製した。この混合物1.2mlを、マルチウェル透析マニフォールド (BRL, Gaithersburg, MD) を用いて2リットルの100mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH 7.4) に対して透析を行った。HSAプールの最終タンパク質濃度は、1100ug/mlであった。組換え sCTLA4 (プールA (モノマー)、B (ダイマー)、およびC (遅いモノマー) のアリコート) またはHSAを、0.05~50ug/mlの濃度で完全培地に懸濁した。50 μ lのアリコートを適切な混合細胞集団のウェルに加えた。試料を3度繰り返してテストした。3℃で5日間インキュベーションした後、各ウェルに2 uCiの³H-チ

ミジンを含む50 μ lの完全培地を入れた。約20時間後、実施例4に記載したように、細胞を回収し、シンチレーションカウントによりDNA中に組み込まれた放射

能を測定した。この実験の結果を表2に示す。

表 2

Q-セファロースカラムクロマトグラフィーにより得られたsC
TLA-4プールA、B、およびCによる、混合リンパ球反応にお
けるリンパ球増殖の阻害（ヒト被験体CおよびD）

用量 Ino/ml	cpm*				阻害%			
	プールA	プールB	プールC	HSA	プールA	プールB***	プールC	HSA
0	12,958	15,378	9,940	10,703	0	0	0	0
10	15,127	9,727	12,767	10,587	-35%	61% (48%)	-40%	2%
100	14,584	8,359	9,100	10,870	-18%	96% (75%)	12%	-2%
1,000	7,095	8,153	7,372	10,297	45%	109% (85%)	36%	5%
10,000	3,983	3,029	5,000	8,084	95%	131% (102%)	70%	22%

* 1分あたりのカウント。3連のウェルの平均。プールAおよびBを1個の96ウェルプレートでテストし、プールCおよびHSAを別のプレートでテストした。

** 初めに同数の被験体CおよびDの非混合細胞のcpmをcpm総数から差し引いた後、阻害パーセントを決定した。これらの「非刺激細胞」のcpm総数は、sCTLA-4プールA、B、C、およびHSAについてそれぞれ3907、6002、2847、および3204であ

った。負の阻害パーセントは、刺激を示す。

*** プールBの「非刺激細胞」のcpm総数は、他のプールのcpm総数よりも多かったため、別の3個のテスト試料の「非刺激細胞」のcpmの平均値(3319cpm)を用いてプールBについての阻害パーセントをまた、計算した。修正阻害パーセントをプールBのカラムの括弧内に示す。

データにより、DNA中に取り込まれた放射能が減少することにより証明されたように、組換えCTLA4（プールA、B、およびC）を含む各々のQ-セファロース

プールは、混合リンパ球反応において、用量依存性リンパ球増殖阻害を起こすことがわかる。HSAでは顕著な阻害は見られなかった。このことにより、阻害はSCTLA4に特異的であることが示された。プールBは、CTLA4ダイマーを主に含有しており、プールA（ほとんどがCTLA4モノマー）またはプールC（ほとんどが凝集したCTLA4モノマー、ダイマー、およびより大きい分子量形態）よりも有効な増殖応答インヒビターであった。リンパ球増殖を50%阻害したプールBの用量は、10ng/mlよりわずかに少ない値となった。この数値は、プールBの有効性を過大評価している可能性がある。なぜなら、阻害パーセントを計算するために用いた非混合リンパ球細胞集団のカウント数/分（cpm）は、プールB試料の方が他のプールでよりも大きかったからである（表2の脚注を参照）。このことを説明するために、他のタンパク質プールの非混合細胞集団の平均cpmを用いて、プ

ールBのデータをまた計算した。これらの修正阻害パーセントを表2の括弧内に示す。修正値を用いると、リンパ球増殖を50%阻害したプールBの用量は約10ng/mlとなった。プールBタンパク質濃度が1~10ug/mlのときに、リンパ球増殖は本質的に完全に阻害された。リンパ球増殖を50%阻害したプールAおよびCの用量は、プールAについては100ng/mlと1,000ng/mlとの間であり、プールCについては1000ng/mlと10,000ng/mlとの間であった。このように、ほとんどCTLA4ダイマーを含有するプール（プールB）は、ほとんどCTLA4モノマーまたはモノマー凝集物を含有するプール（プールAおよびC）に比べて10倍から100倍の特異的阻害活性を有していた。

プールA、B、およびCを、ヒト被験体EおよびFから得たリンパ球を用いる第2の混合リンパ球反応実験でテストした。個体F由来のリンパ球を、実施例4に記載したようにマイトマイシンCで処理した。この実験の他の手順は、実施例4および先の実験に記載した通りであった。この実験の結果を表3に示す。

表 3

Q-セファロースカラムクロマトグラフィーにより得られたsC
TLA-4プールA、B、およびCによる、混合リンパ球反応にお
けるリンパ球増殖の阻害（ヒト被験体EおよびF）

用量 (ng/ml)	cpm*				阻害 % **			
	プーA	プーB	プーC	HSA	プーA	プーB	プーC	HSA
0	28,920	32,243	31,031	29,875	0	0	0	0
1	26,478	27,898	30,301	25,214	9%	15%	3%	16%
10	28,344	24,476	29,927	26,501	2%	26%	4%	12%
100	27,541	20,268	21,320	28,255	5%	40%	34%	5%
1,000	24,687	17,645	18,051	26,891	16%	49%	45%	10%
10,000	13,222	10,402	18,050	25,405	59%	73%	52%	16%

* カウント数/分。3連のウェルの平均。プールAおよびB
を1個の96ウェルプレートでテストし、プールCおよびHSA
を別のプレートでテストした。

** 初めに同数の被験体EおよびFの非混合細胞のcpmをcpm総
数から差し引いた後、阻害パーセントを測定した。これらの
「非刺激細胞」のcpm総数は、sCTLA-4プールA、B、C、お
よびHSAについてそれぞれ2372、2280、2400、および2590であ
った。

先の実験でわかったように、プールBは、リンパ球増殖阻害においてプールA
およびCよりも有効であった。この実験におけるプールBでの阻害は、最高73%
であった。リンパ球

増殖を50%阻害したプールBの用量は、約1ug/mlであった。これに対して、リ
ンパ球増殖を50%阻害したプールAおよびCの用量は、約10ug/mlであった。HSA
では顕著なリンパ球増殖阻害は見られなかった。

この実験では、組換えsCTLA4プールのいずれもリンパ球増殖を完全には阻害し

なかった。このことについては、幾つかの可能な説明が考えられる。1つの説明として、プールA、B、およびCのsCTLA4タンパク質が試料を混合する間に不活性化されたということが考えられ得る。別の説明として、CTLA4リガンド以外の共刺激性分子B7が被験体の抗原存在細胞の表面で発現されたということが考えられ得る。B7とは異なる共刺激性分子が存在することは公知である (Razi-Wolfら、Proc. Nat'l Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4210-4214 (1992) ; Liuら、Eur. J. Immunol., 22:2855-2859 (1992))。1人の被験体は、通常の約4倍の白血球数を有しており、このことにより、この被験体が最近感染症を患ったことが示唆された。この被験体の白血球には、その結果として活性化されていたものがあつた可能性がある。これが事実であり得ることは、この実験で見られたリンパ球増殖の刺激が、先の2種の実験 (非混合細胞で見られたレベルに対して3~4倍) よりも大きかつた (非混合細胞で見られたレベルに対して11~14倍) ことにより示唆される。プールBで観測された73%の阻害が、この実験においてsCTLA4で達成され得た最高程度の阻害であると仮定すると、この最高程度の阻害の50%を行うプールBの用

量は、10ng/mlと100ng/mlの間であつた。これは、先の2種の実験で決定された50%阻害用量と同程度である。

実施例7

安定なB7発現性細胞株の開発

混合リンパ球反応の代わりとして、PHAレクチン存在下でのヒトT細胞株および安定に形質転換してヒトB7レセプタータンパク質を発現するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株によるIL-2産生を測定する、新規なバイオアッセイを開発した。このIL-2バイオアッセイは、混合リンパ球反応に対して幾つかの利点を有する。これらの利点には、IL-2バイオアッセイは1日半しかかからないのに対し、混合リンパ球反応は6~7日かかり、IL-2バイオアッセイは、細菌性エンドトキシン (細菌から調製されたsCTLA4調製物を汚染し得る) に感応性がないのに対し、混合リンパ球反応は、エンドトキシンが存在すると疑似データを生じ、そしてIL-2アッセイは初代細胞よりむしろ細胞株を使用し、それにより感染の危

険が減少し、アッセイ用の大量の細胞を得るのがより容易であるという事実が含まれる。このバイオアッセイの開発には、ヒトB7 cDNAをクローニングし、真核細胞での発現のための適切なベクター内にそれをクローニングし、形質転換し、そしてB7レセプタータンパク質を発現するCHO細胞を選択することが必要であった。

A. ヒトB7 cDNAのクローニング

B7遺伝子をヒトRaji B細胞株 (ATCC番号CCL 86) からクローニングした。製造業者の指示に従って、Micro-FastTrack mRNA Isolation Kit (Invitrogen, San Diego, CA) を用い、mRNAを 3×10^6 個のRaji細胞から単離した。cDNA Cycle Kit (Invitrogen, San Diego) を用い、mRNAの1/10のcDNAのコピーを作製した。B7配列の5' および3' 末端と相補的なオリゴヌクレオチドプライマー、Pfuポリメラーゼ (Stratagene, San Diego) 、およびGene Amp System 9600 Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, CA) を用いたPCRによって、Raji cDNAの1/5のB7遺伝子を増幅した。

以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用した：

B7 (5'P) 32: 5' CCC AAG CTT TCA CTT TTG ACC CTA AGC ATCTG 3' (配列番号: 10)

B7 (3'P) 36: 5' CCC TCT AGA TTA TAC AGG GCG TAC ACT TTC CCT TCT-3' (配列番号: 11)

(B7配列との重複部分にアンダーラインを付す)

PCR反応混合物は、20mM Tris-HCl pH 8.2、10mM KCl、6mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1.5mM MgCl_2 、0.1% Triton X-100、各200 μM のdATP、dCTP、dGTP、およびTTP、各20pmolのプライマーオリゴ、4 μl のRaji cDNA、および0.5 μl (1.25u) のPfuポリメラーゼ (全量=50 μl) を含有していた。PCR条件は (95℃で1分、60℃で1分、および72℃で1分) を30サイクルであり、次に72℃で10分のインキュベーションを行った。PCRが完結した後、4

5 μl の反応混合物をスピンカラム (spin column) (ChromaSpin-100, ClonTech

, Palo Alto, CA) に通過し、次いで20 μ lをXbaIおよびHindIIIで消化し、そして0.8%のアガロースゲル上で電気泳動した。約0.9kbのバンドを溶出し、そして同じ制限酵素で切断しそして同じ方法でゲル精製したプラスミドpRc/CMV (Invitrogen, San Diego, CA) と連結した。連結混合物を、*E. coli*株TOP10F' (Invitrogen, San Diego, CA) を形質転換するために用いた。50 μ g/mlのアンピシリンを含有するLuria Broth寒天平板上で選択したコロニーを、正しいサイズの挿入物を含むプラスミドについてスクリーニングし、そしてこのような1つの構造物に由来の挿入遺伝子を、それが期待した配列を有することを確認するために、両方の鎖全体について十分配列決定した。このプラスミドクローンをB7-5と名付けた。

B. 安定なB7発現細胞株の調製

チャイニーズハムスターの卵巢細胞 (CHO-K1, ATCC番号: CCL 61) を、DMEMおよびペニシリン、ストレプトマイシン、グルタミン、プロリン (20 μ g/ml)、および10%ウシ胎児血清中で増殖した。滴定実験によって、400 μ g/mlの抗生物質G418 (硫酸ゲンタマイシン, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) がCHO細胞を殺傷するのに充分であることを決定した。B7遺伝子を発現するために用いるpRc/CMVベクターは、G418に耐性を与えるアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含む。

CHO細胞をトランスフェクトするために用いるB7-5プラスミドを、Qiagenミニプレップ手順 (Qiagen, Chatsworth, CA) を用いて調製し、ここで、50 μ g/mlのアンピシリンを有するLuria Broth中で一晚増殖した19.2mlの培養物は、約1256 μ g/mlのプラスミドDNAを120 μ l生成した。製造業者の指示に従い、Invitrogen (San Diego, CA) 製のキットを用いたリン酸カルシウム沈澱法により、CHO細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションして4日目に、培地を、G418を400 μ g/mlで含有する新しい培地と交換した。トランスフェクションして19日目に、個々の耐性細胞を選択するため、G418耐性細胞を限界希釈した。6個の個別のコロニーを単離し、そして2回目の限界希釈を行った。それぞれの1個のウェルを増殖のために選択した。細胞株をF9、C11、C10、E12、C12、およびH9と名付

けた。

C. 形質転換B7-CHO細胞株のFACSスクリーニング

6種のG418耐性細胞株を、それらが細胞表面上にB7を発現するかどうかを決定するために、抗ヒトB7モノクローナル抗体でスクリーニングした。各細胞株のコンフルエントになったT-75フラスコを、カルシウムおよびマグネシウムを含まないPBS10mlで2回洗浄し、そして10mM EDTAを含有しカルシウムおよびマグネシウムを含まないPBS10mlに室温で10分間曝した。細胞をほぐすため上下に数回ピペッティングした後、はがれた細胞を15mlの円錐形遠心管に移し、そしてGS-6R

ブロット遠心分離機 (Beckman instruments, Houston, TX) を用いて1000rpmで遠心分離した。120マイクロリットルの氷冷したFACS培地 (2% (v/v)のウシ胎児血清および0.1%のアジ化ナトリウムを含有するRPMI 1640培地 (Biowhittaker, Walkersville, MD, カタログ番号12-115B)) 中に細胞を再懸濁した。細胞の濃度は、1mlあたり約 2×10^7 個であった。50マイクロリットルの各細胞株を、氷上の1.5mlのマイクロヒュージチューブ (microfuge tube) 中で、1:1000に希釈した抗ヒトB7モノクローナル抗体 (Becton Dickinson, San Jose, CA, カタログ番号550024) またはコントロールマウスのIgG1モノクローナル抗体 (Becton Dickinson, San Jose, CA, カタログ番号550029) を含むFACS培地50マイクロリットルと混合した。細胞を抗体と共に氷上で55分間インキュベートし、マイクロヒュージチューブをFACS培地で満たし、次いでマイクロヒュージチューブ中で $300 \times g$ にて5分間遠心分離した。上清を吸入により除去し、そして1:25に希釈したFITC-標識ポリクローナルヤギ抗マウス抗血清 (Becton Dickinson, San Jose, CA, カタログ番号349031) を含有する氷冷したFACS培地100マイクロリットル中に細胞を再懸濁した。混合物を氷上で55分間インキュベートし、チューブを氷冷したFACS培地で満たし、そしてマイクロヒュージチューブ中で $300 \times g$ にて5分間遠心分離した。上清を吸引し、そして細胞を、氷冷したFACS培地500マイクロリットル中に再懸濁した。標識細胞をフローサイトメーターを用いて陽性の蛍光について分析した。このアッ

セイを用いると、細胞株F9、C12およびH9は、B7の発現について陽性であった。

D. IL-2産生バイオアッセイ

PHA-Lレクチン (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, カタログ番号L-4144) の存在下で、F9、C12およびH9細胞株をCD28-陽性ヒトJurkat T細胞株 (ATCC 番号CRL 1863) と混合し、それらがJurkat細胞によりIL-2の産生を誘発するかどうかを決定した。96ウェルの組織培養プレートの各ウェルに、 1×10^5 個のJurkat細胞および 5×10^4 個のF9、C12、H9または親CHO細胞を加えた。コントロールのウェルはJurkat細胞のみを含んでいた。PHAを各ウェルに加え、最終濃度を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ とした。1ウェルあたりの最終容量は $250 \mu\text{l}$ であった。細胞および化学物質をIL-2アッセイ培地 (25mM HEPESバッファー、ペニシリン、ストレプトマイシン、グルタミン、および10%ウシ胎児血清を含有するRPMI 1640培地 (Biowhittaker, Walkersville, MD, カタログ番号12-115B)) に再懸濁した。F9、C12、H9および親CHO細胞を、10mM EDTAを含有し、カルシウムおよびマグネシウムを含まないダルベッコPBS中でインキュベートすることによりそれらの培養皿から剥離した。剥離した細胞を、カウントおよびプレートに入れる前にIL-2アッセイ培地中で数回洗浄した。アッセイは3重測定で行った。よく混合した後、プレートを、標準的な組織培養インキュベーター中にて 37°C で約20~24時間インキュベートした。次いで、

各ウェル中の液体をピペッティングにより混合し、そして $100 \mu\text{l}$ をIL-2 ELISAアッセイプレート (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) の新しいウェルに移した。

ELISAアッセイに用いる手順は、IL-2アッセイ培地をブランクとして用いること以外は、製造業者により提供されるものであった。ウェルの光学密度をマイクロプレートのプレートリーダー (Molecular Devices, Menlo Park, CA) で450nm~570nmにおいて測定した。光学密度は試料中のIL-2の量を反映する。3重測定のウェルの光学密度の平均値を計算し、そしてIL-2標準曲線を用いてIL-2の pg/ml に換算した。結果は、B7-CHO細胞株、F9、C12およびH9細胞が、それぞれ、 $360 \text{pg}/\text{ml}$ 、 $300 \text{pg}/\text{ml}$ および $150 \text{pg}/\text{ml}$ のIL-2の産生を誘発することを示した。親細胞の

トランスフェクトしていないCHO細胞は、20pg/mlのIL-2を誘発した。Jurkat細胞単独では20pg/mlのIL-2を産生した。これらの結果は、F9、C12およびH9細胞株はJurkat T細胞によりIL-2の産生を誘発し得ることを示した。さらなるアッセイの開発のために、C12細胞株を選択した。コントロール実験は、バックグラウンドレベルを超えてIL-2の産生を誘発するためには、PHAが必要とされることを示した。滴定実験は、バイオアッセイにおいて1ウェルあたりのC12細胞の数が増加すると、IL-2の産生は用量依存的に増大することを示した。応答は直線的ではなく、より対数的であった。sCTLA4調製物の生物活性を測定するのに用いられる標準的なIL-2産生アッセイでは、上記のバイオアッセイにおいて、1ウェルあたり2.

5×10^4 個のC12細胞、 1×10^5 個のJurkat細胞、および $10 \mu\text{l/ml}$ のPHAが用いられる。CTLA4はC12細胞上のB7と結合しそしてB7を中和するので、CTLA4をテスト用ウェルに添加するとIL-2の産生が減少し、これは、テスト用ウェルの光学密度の減少により測定される。

実施例 8

適切に再折り畳みされたsCTLA4ダイマーの同定および精製

実施例 5 に記載されるように、ほとんどのsCTLA4の再折り畳み体は、24-27kDaの分子量範囲の複数の（典型的には少なくとも3つの）ダイマー型を含む。このダイマー種は、SDS-PAGE (14%非還元SDSゲル) により、および実施例 8 B に記載されるようにRP-4カラムを用いる逆相クロマトグラフィーにより分割され得る。異なるダイマー型は、IL-2産生アッセイにおけるこれらの生物活性が異なる。ダイマー型のうち1つだけが、このアッセイにおいてIL-2産生を顕著に阻害し得る。この顕著な比活性を有するダイマー型は、おそらく適切に折り畳まれているが、低活性ダイマー型はおそらく不適切に折り畳まれている (misfolded)。この異なるダイマー型を、サイジングカラムを用いて互いに分離し得る。この最も活性なダイマー種は、実施例 8 D および下記の表 6 に記載されるようにカラムから最後に溶出する（より小さい見掛けの分子量である）。「活性」および「低活

性」ダイマー種を、以下の実施例に記載されるように互いに分離した。再折り畳み手順2（以下に記載）を用いて得られる活性および低活性ダイマー型は、Mono Q、Source 15Qイオン交換カラムを用いて、またはフェニルセファロース疎水性相互作用カラムを用いることにより互いに分離され得た。

A. 再折り畳み手順1

30gのWIBSを2000mlの新たに作製した6MグアニジンHCl、0.1M Tris pH8.0、6mM DTTに、polytron PT 3000 (Brinkman Instruments, Lucerne, Switzerland)を用いて溶解し、室温で15分間放置した。次いで、この溶液をJA-10ローター中10,000rpmで30分間遠心分離し、そしてペレットを捨てた。この上清に110mlの0.5Mグルタチオン（酸化型）を加えた。この溶液を室温で15分から30分間放置して、次いで緩やかに攪拌しながら18リットルの50mM Tris pH9.7中0.44MグアニジンHClにゆっくりと加えた。次いで、200mlの0.5Mシステインおよび200mlの100mMフェニルメチルスルホニルフルオライド（エタノール中）を加えた。この再折り畳み混合物を4℃で6日間攪拌せずに放置した。この時点で、この混合物をS10Y3スパイラルウルトラフィльтраーションカートリッジ (Amicon, Beverly, MA)で約1リットルに濃縮し、そしてSpectra/Por 3チューブ (Spectrum Medical Industries, Houston, TX) 中で19容量の20mM Tris pH8.0に対して2日から3日間透析した。多量の沈殿をJA-10ローター中10,000rpmで15分間遠心することにより除去した。残りの沈殿を、上清を0.45 μ mフィルターに通すことによりを除去した。この上清を、300mlのQ-セファロース (Fast Flow; Pharmacia, Piscataway, N.J.) カラム上に10ml/分でかけた。タンパク質を、10ml/分で20mM Tris pH8.0中1M NaClの0%から60%の勾配を用いてカラムから溶出した。

30%から40%の領域（約300mMから400mM NaCl）の各画分のアリコート（25 μ l）を非還元14% SDSゲル上で電気泳動した。クマシーブルーR250で染色した場合、活性ダイマー種は非常にくっきりしたバンドとして識別され得るが、不活性または低活性のダイマー種（「低活性ダイマー」）はより広がっている。この区別は容易に明らかである。この低活性ダイマー種は、典型的には、14%非還元SDS

ゲル上で活性ダイマーより若干高い見掛けの分子量を有する。1つの低活性ダイマー種は、しばしば、活性ダイマー種とSDSゲル上を共移動する。この低活性ダイマー種は、下記のサイジングカラムを用いて活性ダイマー種と区別し得る。活性ダイマー種を含むQ-セファロースカラム画分をプールし、そしてAmicon攪拌セル中のYM-10膜 (Amicon, Beverly, MA) を用いて約40mlに濃縮した。この濃縮活性ダイマープールを、250mM NaCl、20mM Tris pH7.5のバッファー中で26ml/分で7リットル、85cmセファクリルS-100 (Pharmacia) カラム中に通した。主タンパク質ピーク (タンパク質は画分のA_{280nm}での吸光度を測定することにより検出された) にわたる各画分のアリコート (25 μ l) を上記のように14%非還元SDSゲル上で電気泳動した。活性ダイマー種は、不活性ダイマー種より遅れて溶出する。このサイジングカラムの工程は、ほとんどの他の混入タンパク質およびほとんどの低活性ダイマー種を除去する。理論的に純粋な活性ダイマーを含む画分をプールし、そしてAmicon攪拌セル中のYM-10膜 (Amicon Inc., Beverly, MA) を用いて約10mlに濃縮した。タンバ

ク質濃度を、タンパク質標準物質 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) としてのIgGを用いて、Lowryタンパク質アッセイキット (「DCタンパク質アッセイ」, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) を用いて測定した。

B. 再折り畳み手順2

実質的により多い活性CTLA4ダイマーが、再折り畳み手順を改変することにより、再折り畳み混合物から回収し得ることが見出された。再折り畳み手順2は、開始WIBSのグラム当たり実質的により多い活性CTLA4ダイマーを生じる改良された再折り畳み手順である。酸化グルタチオンおよびシステインは、典型的には、細菌由来の組換えタンパク質を再折り畳みするために用いられる混合物中に含まれ、これを再折り畳み混合物から除去することによりかなりのコスト削減となる。酸化グルタチオンおよびシステインは、活性CTLA4ダイマーの正しい再折り畳みを妨害するようである。酸化グルタチオンおよび/またはシステインはCTLA4のシステイン残基に結合し、そしてタンパク質再折り畳みおよび/または正しいジスルフィド結合形成を妨害すると考えられている。再折り畳み手順2では、WIBS

を最初に還元するために用いられたDTTの他に、追加の酸化剤または還元剤を再折り畳み混合物に加えない。以下に、30gのWIBSで開始する典型的な再折り畳みを示す。

30gのWIBsを600mlの新たに作製した6 MグアニジンHCl、50mM Tris pH8.5に、polytron PT 3000 (Brinkman Instruments)

を用いて溶解し、次いで室温で30分間ゆっくりと撹拌した。7.2mlの0.5M DTT (最終DTT濃度=6 mM) を加え、そしてこの溶液を室温で1時間ゆっくりと撹拌した。次いで、この溶液をJA-10ローター中で10,000rpmで30分間遠心分離し、そしてペレットを捨てた。この上清を、343.9gのグアニジンHCl、10.9gのTris-HCl、および60.6gのTris塩基を11.4リットルの水に溶解して含む11.4リットルのグアニジン/Tris溶液にゆっくりと加えた。この再折り畳み混合物を4℃で3日間放置した。次いで、この溶液をSA-1連続フロー遠心分離 (flow centrifuge) (Westfalia, Oelde, Germany) により200ml/分、14psiで通し、続いて2リットルの0.6MグアニジンHCl、50mM Tris pH9.5で4℃で追跡した。この上清をスパイラルウルトラフィルトレーションカートリッジ (S10Y3, Amicon Inc., Beverly, MA) を用いて約1リットル~2リットルまで濃縮し、そしてSpectra/Por 3 チューブ (Spectrum Medical Industries, Houston, TX) 中で19リットルの20mM Tris pH7.5に対して4℃で1日透析した。透析バッファーを交換し (同じ溶液および同じ容量で)、そして4℃でさらに1日透析を継続した。生じた多量の沈殿をJA-10ローター中で10,000rpmで15分間遠心分離することにより除去した。残りの沈殿を、上清を0.45 μ mフィルターに通すことによりを除去した。この溶液を、50mlのSource 15Q (Pharmacia) カラムに10ml/分でかけた。タンパク質を、10ml/分で20mM Tris pH8.0中1 M NaClの0%から60%の勾配を用いてカラムから溶出した。約300mM NaClで溶出した主タンパク質

ピーク由来の各画分のアリコート (10 μ l) を非還元14% SDSゲル上で電気泳動した。クマシーブルーR250で染色した場合、「活性」ダイマーは非常にくっきりしたバンドとして識別され得るが、「低活性」ダイマーのバンドはより広がってい

る。この区別は容易に明らかである。再折り畳み手順1とは対照的に、再折り畳み手順2を用いて形成する低活性ダイマーは、14%非還元SDSゲル上で活性ダイマー種より典型的には低い見掛けの分子量を有する。活性ダイマーを含む画分をプールし、そして攪拌セル中のYM-10膜 (Amicon) を用いて約40mlの容量に濃縮した。この濃縮活性ダイマープールを250mM NaCl、20mM酢酸ナトリウム pH5.5中で26ml/分で7リットル、85cmセファクリルS-100 (Pharmacia) カラムに通した。主タンパク質ピーク ($A_{280\text{nm}}$ での吸光度により検出された) にわたる各画分のアリコート ($10\mu\text{l}$) を上記のように14%非還元SDSゲル上で電気泳動した。活性ダイマーは低活性ダイマーより遅れて溶出する。このサイジングカラムの工程は、ほとんどの他の混入タンパク質およびほとんどの活性ダイマーを除去する。主として活性ダイマーを含む画分をプールし、そして攪拌セル中のYM-10膜 (Amicon Inc., Beverly, MA) を用いて約10mlに濃縮した。タンパク質濃度を、タンパク質標準物質としてのIgG (Bio-Rad Laboratories) を用いて、Lowryタンパク質アッセイキット (「DCタンパク質アッセイ」, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) を用いて測定した。

逆相HPLCにより、上記の手順により得られたこの活性ダイ

マー種の特徴をさらに調べた。精製した活性CTLA4ダイマーのアリコート ($50\mu\text{l}$ - $100\mu\text{l}$) をバッファーA (0.05%トリフルオロ酢酸「TFA」) で $500\mu\text{l}$ に希釈し、そして逆相カラム (RP-4, $1 \times 250\text{mm}$, Synchrom, Lafayette, IN) に注入し、そして100%のアセトニトリル、0.042% TFA (バッファーB) で直線勾配 (2.6% バッファーB/分の増加) を用いて、0.25ml/分の流速で溶出した。正しく再折り畳みした活性CTLA4ダイマーが27.8分のところで対称のピークとして溶出した。

表4は、手順1および手順2を用いるいくつかの再折り畳み実験から得られた良好なダイマー (good dimer) の収量を比較する。手順1を用いて得られたものの4~5倍も多い活性ダイマーが手順2から得られたことが表から明らかである。

表 4

実験	開始 WIBS	回収されたSCTLA4
RF 16	30g	23mg
RF 17	30g	14mg
RF 19	30g	25mg
RF KC	36g	16mg
RF 22	30g	76mg
RF 23	30g	143mg
RF 24	30g	110mg
RF 25	30g	83mg

実験RF16、RF17、RF19およびRF-KCは再折り畳み手順1を用いた。
実験RF22、RF23、RF24およびRF25は再折り畳み手順2を用いた。

C. 再折り畳み手順3

再折り畳み手順3では、0.4gのWIBSを8mlの6Mグアニジン、50mM Tris-HCl pH8.5に溶解した。4mlのこの溶液をDTTを6mMの最終濃度に加えることにより還元した。2mlのこの溶液を50mM Tris-HCl pH9.5で20mlに10倍希釈した。このグアニジン濃度は1Mに維持した。最終DTT濃度は0.6mMであった。タンパク質を3日間4℃で再折り畳みした。20mM Tris-HCl, pH8に対して透析後、このタンパク質を20mM Tris-HCl, pH8のバッファー中でMono-Qカラム (Pharmacia HR5/5カラム) にかけた。

タンパク質を20mM Tris-HCl pH8中の0～600mMのNaClの直線勾配で1ml/分 (10mM NaCl/分の増加) で溶出した。このカラムプロフィールは、画分32および33に溶出される主タンパク質ピーク、続いて画分34から37に溶出されるより小さい広いタンパク質ピークを示した。SDS-PAGE分析は、画分32および33の主タンパク質種が再折り畳み手順1を用いて得られた活性ダイマー種と共移動したことを示す

。画分34から37は少なくとも3つのダイマー種を含んでいた。そのうちの1つは、(少ない成分) 活性ダイマー種とSDSゲル上を共移動した。他の2つのダイマー種は、活性ダイマー種より少し速く移動した(すなわちより低い見掛けの分子量)。画分35および36はこれらのより速く移動するダイマー種に富んでいた。どのダイマー種が最大の活性を有するのかを決定するために、画分32および33を合わせ、そして画分35および36を合わせた。2つのプールをIL-2産生バイオアッセイでテストした。タンパク質濃度をウシ血清アルブミンを標準物質として用いて、Bradfordアッセイにより測定した。ウシ血清アルブミンの標準物質としての使用で、IgGを標準物質として用いる場合に得られた濃度の約半分であるタンパク濃度を回収した。この結果(表5)は、画分32および33のプールが約100ng/mlの IC_{50} で最大の阻害活性を有したことを示す。これは、再折り畳み手順1を用いて精製した活性CTLA4ダイマー種の IC_{50} と同等である。画分35および36のプールはほとんど滴定し得ない阻害活性を示し、そして3 μ g/mlより大きい IC_{50} を有した。

表 5

タンパク質 ($\mu\text{g/ml}$)	光学密度 (450 - 570 nm)*	
	γ -1レ 32/33	γ -1レ 35/36
0	$.319 \pm .011$	$.276 \pm .036$
0.0015	$.312 \pm .013$	$.247 \pm .020$
0.0045	$.307 \pm .060$	$.242 \pm .010$
0.014	$.222 \pm .023$	$.257 \pm .044$
0.04	$.208 \pm .008$	$.241 \pm .014$
0.12	$.173 \pm .024$	$.232 \pm .011$
0.37	$.118 \pm .009$	$.210 \pm .017$
1.1	$.117 \pm .014$	$.193 \pm .010$
3.3	$.056 \pm .006$	$.177 \pm .035$
10	$.053 \pm .006$	$.114 \pm .008$

* 値は3重測定の平均 \pm 1標準偏差である。タンパク質濃度はウシ血清アルブミンを標準物質として用いて測定した。

画分32および33の主タンパク質は、再折り畳み手順2を用いて得られた主タンパク質ピークの主タンパク質に、分子量 (SDS-PAGEによる) および物理学的特徴 (イオン交換カラムの溶出時間) で類似している。画分35および36の低活性ダイマー種は、再折り畳み手順2を用いて得られた不適切に折り畳まれたダイマー種と同一でない場合には、似ている。

D. 活性および低活性ダイマー種のサイジングカラム上での分離

RF-KCの実験では、CTLA4は再折り畳み手順1に概略したように再折り畳まれ、ダイマーは本質的にQ-セファロースカラムから精製された。少なくとも3つのダイマー種は非還元SDS-PAGEにより識別され得た。正しいまたは最も活性なダイマー種が、この実験の少量の総ダイマー種を構成していた。主なダイマー種を含む画分 (画分89-109) をプールし、222mlに濃縮し、そして再折り畳み手順1に記

載されたようにS-100サイジングカラムにかけた。CTLA4ダイマーは、主タンパク質ピーク（画分33-41を含む）、続く小さなショルダーピーク（画分42-54を含む）として溶出された。非還元SDS-PAGE分析は、かなりの量の低活性ダイマー種（ショルダーピーク中の総タンパク質の少なくとも50%）を含むが、このショルダーピークが活性ダイマー種に富んでいることを示した。主タンパク質ピークは、主に低活性ダイマー種である複数のダイマー種を含んでいた。主タンパク質ピークはほとんど活性ダイマー種を含まなかった。主タンパク質ピーク（画分33-41）をプールし（プールAと呼ぶ）、そしてIL-2産生バイオアッセイで活性をテストした。同様に、ショルダーピーク（画分42-54）をプールし（プールBと呼ぶ）、バイオアッセイで活性をテストした。この結果（表6）は、プールBのみが顕著な阻害活性を有することを示した。プールAの IC_{50} は $10\mu g/ml$ より大きかったが、プール

Bの IC_{50} は、 $120-370ng/ml$ であった。活性ダイマー種をさらに精製するために、プールB（画分42-54）をプールし、 $40ml$ に濃縮し、そしてS-100カラムに再びかけた。 $1750ml$ のバッファーがカラムを通過するまでは、画分は集めなかった。次いで、 $25ml$ の画分の回収を始めた。CTLA4ダイマーは、2つの重複したタンパク質ピークとして溶出された：複数のダイマー種を含む初期に溶出するピーク（画分28から35）、および単一のダイマー種に富む後期に溶出するピーク（画分36から44）。2つのタンパク質ピーク由来のプール、画分28-35（プールB-1）および画分36-41（プールB-2）を調製し、そしてIL-2産生バイオアッセイでテストした。この結果（表6）は、後期に溶出されるピーク（プールB-2）は、 120 および $370ng/ml$ の間の IC_{50} を有し、最も活性であること；初期に溶出されるピーク（プールB-1）は約 $10\mu g/ml$ の IC_{50} を有し、非常に低活性であることを示した。

表 6

タンパク質 ($\mu\text{g/ml}$)	光学密度 (450 - 570 nm)*			
	プールA (画分 33-41)	プールB (画分 42-54)	プールB-2 (画分 36-41)	プールB-1 (画分 23-33)
0	$.556 \pm .124$	$.556 \pm .124$	$.298 \pm .019$	$.341 \pm .011$
0.0015	$.581 \pm .021$	$.590 \pm .039$	$.293 \pm .011$	$.362 \pm .045$
0.0045	$.523 \pm .016$	$.515 \pm .015$	$.272 \pm .020$	$.383 \pm .027$
0.014	$.463 \pm .033$	$.579 \pm .007$	$.243 \pm .023$	$.305 \pm .023$
0.04	$.573 \pm .025$	$.473 \pm .032$	$.196 \pm .006$	$.379 \pm .037$
0.12	$.520 \pm .015$	$.424 \pm .004$	$.134 \pm .007$	$.348 \pm .020$
0.37	$.568 \pm .049$	$.298 \pm .023$	$.154 \pm .021$	$.271 \pm .050$
1.1	$.514 \pm .034$	$.247 \pm .020$	$.088 \pm .019$	$.256 \pm .029$
3.3	$.421 \pm .032$	$.201 \pm .019$	$.039 \pm .078$	$.177 \pm .021$
10	$.375 \pm .010$	$.099 \pm .002$	$.067 \pm .027$	$.169 \pm .072$

* 値は、3重測定の平均値 \pm 1標準偏差である。Jurkatセルのみの値は、プールAおよびB、プールB-2およびプールB-1の実験で、それぞれ 0.089 ± 0.039 、 0 ± 0.005 および 0 ± 0.006 であった。

E. 再折り畳みCTLA4の追加の精製

精製をイオン交換カラムのみを用いて達成した以外は、再折り畳み手順8Bカラムに従って実質的に調製されたCTLA4ダ

イマープールを、20mM Tris, pH7.4、250mM NaClで予め緩衝化した疎水相互作用カラム (HIC) (フェニルセファロース、5mm \times 5cm、Pharmacia、Piscataway, NJ) に直接かけた。この結合タンパク質を30カラム容量で20mM Tris, pH7.4、50% アセトニトリル (CH_3CN) の直線勾配を用いて1ml/分の流速で溶出した。CT

LA4は2つのピークとして溶出された：15% CH₃ CNで溶出される主ピーク、および25% CH₃ CNで溶出される小さなピーク。SDS-PAGE分析は、主ピークが正しく再折り畳みされた活性CTLA4ダイマーに対応し、小さなピークがより低い相対分子量で移動する不適切に折り畳まれた低活性CTLA4ダイマー種に対応することを示した。

実施例 9

異なる CTLA4精製調製物のバイオアッセイ

再折り畳み手順1を用いて精製したCTLA4活性ダイマーを、上記のIL-2産生アッセイを用いて、活性についてアッセイした。CTLA4タンパク質をIL-2アッセイ培地を用いて、所望の濃度まで希釈し、10 μ g/mlのPHAの存在下でB7⁺-CHO細胞（C12細胞）2.5 \times 10⁴ およびJurkat細胞1 \times 10⁵と混合し、そして組織培養インキュベーター中、37℃で約24時間インキュベートした。各タンパク質希釈物を、96ウェルの組織培養プレート（Corning, Corning, NY）を用いて、3回ずつアッセイした。ジャーカットセル半PHAをコントロールとして使用した。ウェルのIL-2濃度は、上記のようにIL-2 ELISAキットを用いて測

定した。ウェルの光学密度は、ウェル中のIL-2の量に比例する。すなわち、光学密度が高い程、IL-2レベルが高いことを示す。異なるCTLA4ダイマー調製物のIC₅₀（IL-2産生の最大阻害の半分を観察する濃度）は、このアッセイを用いると約100~300ng/mlの範囲であった（表7）。

表 7

タンパク質 ($\mu\text{g/ml}$)	光学密度 (450 - 570 nm) ⁻			
	RF16	RF17	RF19	RF-KC
0	.324 \pm .070	.407 \pm .034	.292 \pm .014	.298 \pm .019
0.0015	.331 \pm .005	.359 \pm .058	.278 \pm .022	.293 \pm .011
0.0045	.278 \pm .027	.226 \pm .017	.274 \pm .021	.272 \pm .020
0.014	.250 \pm .018	.220 \pm .011	.243 \pm .013	.243 \pm .023
0.04	.207 \pm .009	.231 \pm .078	.250 \pm .047	.196 \pm .006
0.12	.151 \pm .014	.128 \pm .006	.160 \pm .004	.134 \pm .007
0.37	.129 \pm .008	.088 \pm .005	.143 \pm .020	.154 \pm .021
1.1	.075 \pm .006	.064 \pm .027	.095 \pm .008	.088 \pm .019
3.3	.070 \pm .011	.023 \pm .006	.081 \pm .010	.039 \pm .078
10	.059 \pm .015	.033 \pm .016	.059 \pm .003	.067 \pm .027

* 値は3つのウェルの平均 \pm 1標準偏差である。Jurkat細胞単独に対する値は、RF16、RF17、RF19およびRF-KCの実験について、それぞれ、 0.035 ± 0.003 、 0.206 ± 0.058 、 0.027 ± 0.002 および 0 ± 0.005 であった。Jurkat細胞単独の値は、RF19の実験において異常に高く、その理由は不明である。

再折り畳み手順2を用いて調製された活性CTLA4ダイマーは、IL-2生産バイオアッセイにおいて類似の IC_{50} を示した。

実施例10

組換えsCTLA4は、動物中の細胞損傷を阻害する

Tiegsら (Journal of Clinical Investigation 90巻、196、1992) は、コンカ

ナバリン A (Con A) により誘導され得る、マウスにおける T 細胞依存性肝臓損傷モデルを記載する。Con-A 誘導肝臓損傷は、8 時間以内に検出可能で Con A の存在下マクロファージによる T 細胞のポリクローナル活性化から生じる。肝臓損傷は、血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (SGPT) を含む、特異的肝臓酵素の血流中への放出により測定される。sCTLA4 のインビボ活性をこのモデルを用いて評価した。CTLA4 タンパク質は、再折り畳み手順 1 を用いて調製された再折り畳み RF-16、RF-17、RF-19 および RF-KC のプール中に含まれていた (表 7)。

18-20g の雌の Balb/C マウスを、Charles River から購入した。マウスに、Con-A (タイプ V、カタログ番号 C-7275; Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) を 0 時間で静脈注射 (15mg/kg) し、-2、0、2、4、および 6 時間に生理食塩水または 0.3、3 または 30mg/kg の CTLA4 を皮下注射した。8 時間目にマウスを殺しそして SGPT の血清レベルを、Ektachem 700 アナライザー (Kodak, Rochester, N.Y.) を用いて測定した。個々のマウスの SGPT 血清レベルを表 8 中に示す。

表 8

・正常 (Con A30)	sCTLA4 用量 (mg/kg/注射)†			
	0	0.3	3	30
118	932	3046	468	316
47	943	108	1981	1386
124	1673	783	525	286
295	420	972	211	260
85	2512	613	519	563
133	1917	1465	466	468
118	1163	4845	969	165
74	4914	1642	382	
77	2502			
57				
N = 10	N = 9	N = 8	N = 8	N = 7

* 正常のコントロールマウスは、Con Aを投与されなかった。

† 実験マウスは、Con Aプラス示された用量のsCTLA4を投与され、与えられた数字は、個々のマウスについてのSGPTレベル(mU/ml)である。

注射あたり、3または30mg/kgのCTLA4を投与されたマウスは、SGPTレベルが統計的に顕著に低下し、Con-Aのみで処理されたコントロールに比べて肝臓損傷がより少ないことを示す ($p < 0.05$)。Dunnettの多重比較を用いた分散分析を、生理食塩水および異なる用量のCTLA4を投与されたグループ間の差異を試験するために実施した。

実施例 1 1

野生型CTLA4のPEG化

A. NHS-PEG試薬を用いたPEG化

CTLA4はモノマーあたり2つのリシン残基を有する。可溶性CTLA4は、NHS-5K-PEG試薬を用いて効果的にPEG化され得、この試薬は、リシン残基に存在する遊離のアミンのような遊離のアミンと優先的に反応する。実施例 8 Eにより調製された活性CTLA4ダイマーを、3000 Da分子量カットオフ (MWCO) 膜 (YM3, Amicon) を含む攪拌圧力セル (Amicon, 50ml) を用いて1.5-4.0mg/mlまで濃縮した。再折り畳みされた可溶性CTLA4を、5,000 kDaのNHS-エステルポリエチレングリコール (5K-NHS-PEG) と反応させた。最終反応混合物は、675mg/ml、(28mM) CTLA4、9 mM TRIS、55mMリン酸ナトリウム、pH 7.0、396mg/ml、(84mM) 5K-NHS-PEG、112 mM NaClを含んでいた。PEG:CTLA4のモル比は3:1であった。反応は、室温で5-6時間行なった。反応混合物は4℃で保存した。SDS-PAGE分析 (非還元条件) は、

PEG化生成物が、相対分子量がそれぞれ46,000 Da、および65,000 Daの位置に移動する主生成物および副生成物からなることを示した。CTLA4出発物質の全体の変換率 (パーセント) は、約50-60%であった。

B. リシン-PEG化生成物の単離

PEG化生成物を含む反応混合物を、等容量の20mM TRIS、pH8.0 (バッファー C) で希釈し、予めバッファー Cで平衡化したアニオン交換カラム (Resource Q, 5mm×50mm、容量=1.0ml、Pharmacia, Piscataway, NJ) にロードした。結合したタンパク質 (および未反応PEG) を1.0 ml/分の流速で0.5M NaClまでの直線勾配 (20カラム容量) で溶出した。0.5mlずつの画分を集めた。PEG化副生成物 (SDS-PAGE上65000 Daの位置に移動する) は、約0.3M NaClで画分 9 および10中に溶出した。PEG化主生成物 (SDS-PAGE上46000 Daの位置に移動する) は、約0.35M NaClで画分11および12中に溶出した。未反応PEGおよび未反応CTLA4ダイマーは、約0.4M NaClで画分14および15中に溶出した。

C. PEG化生成物の分析

PEG化主生成物およびPEG化副生成物の両者のアリコート、および未反応CTLA4

ダイマーを、非還元および還元条件の両方の条件下で、SDS-PAGEにより分析した。未反応CTLA4ダイマーの還元は、相対分子量12000 Daの位置に移動するモノマーを

生じた。PEG化主生成物（非還元SDS-PAGEにより約46,000 Daの相対分子量の位置に移動）の還元は、分子量約12000 Daおよび18000 Daの分子量の位置にそれぞれ移動する非PEG化モノマーおよびPEG化生成物の両者を、1:1のモル比で生じた。このことは、PEG化主生成物（46,000Da）が、モノPEG化ダイマーである、即ち、モノマーサブユニットの1つだけがPEG化されそして単一のPEG分子を含むことを示す。還元後、18000 Daの位置に移動する種は、モノPEG化モノマーである。PEG化副生成物（非還元SDS-PAGEにより65,000Daの相対分子量の位置に移動する）の還元は、1つの主生成物、つまり18000 Daの位置に移動するPEG化生成物を生じた。この18,000 Da PEG化生成物は、モノPEG化モノマーであり、65000 Da PEG化生成物は、二重にPEG化されたCTLA4ダイマーであることを示す。この二重にPEG化された種の還元は、著量の非PEG化モノマーを生じなかったため、各CTLA4モノマーは単一のPEG化リシン残基を含んでいる。少量の、46000 Daの位置に移動するPEG化生成物および非PEG化モノマーの両者がまた、65,000 Da副PEG化生成物の還元後検出された。これらは、少量の、65,000 Da生成物に混じった高MW（67000 Daを超える）のPEG化種からの生成物であるようである。

D. PEG化生成物の生物活性

実施例11Bからの画分9および10（二重PEG化ダイマー）、画分11および12（モノPEG化ダイマー）および画分14および15

（未反応ダイマー）を別々にプールし、濃縮しそして実施例7に記載したIL-2産生バイオアッセイ中の活性についてアッセイした。表9に示された結果は、モノPEG化されたCTLA4は、非PEG化CTLA4の IC_{50} の約3-4倍より大きい IC_{50} を有したと（400ng/ml対100ng/ml）を示す。ジPEG化CTLA4に対する IC_{50} は、非PEG化CTLA4のそれに比べ約6倍より大きかった。

表 9

タンパク質 ($\mu\text{g/ml}$)	光学密度 (450 - 570 nm)*		
	画分 9/10	画分 11/12	画分 14/15
0	$.522 \pm .026$	$.575 \pm .024$	$.597 \pm .022$
0.0015	$.502 \pm .004$	$.553 \pm .032$	$.556 \pm .025$
0.0045	$.486 \pm .010$	$.531 \pm .034$	$.582 \pm .047$
0.014	$.443 \pm .028$	$.552 \pm .029$	$.499 \pm .016$
0.04	$.423 \pm .012$	$.452 \pm .030$	$.391 \pm .013$
0.12	$.415 \pm .045$	$.383 \pm .017$	$.307 \pm .005$
0.37	$.395 \pm .035$	$.325 \pm .024$	$.225 \pm .022$
1.1	$.292 \pm .018$	$.223 \pm .017$	$.114 \pm .008$
3.3	$.219 \pm .009$	$.140 \pm .006$	$.075 \pm .010$
10	$.152 \pm .019$	$.094 \pm .009$	$.057 \pm .003$

* 値は3つのウェルの平均 \pm 1標準偏差である。Jurkat細胞単独に対する値は、画分9/10、画分11/12、および画分14/15実験について、それぞれ、 0.026 ± 0.003 、 0.049 ± 0.004 、および 0.040 ± 0.017 であった。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準として用いて測定した。

本発明の先行する記述は、例証および説明の目的のための例示である。本発明の思想および範囲を逸脱することなく種々の改変がなされ得ることが理解されるべきである。従って、以下の請求項は、そのような改変のすべてを包含するよう解釈されることが意図される。

配列表

(1) 一般的情報:

(i) 出願人: コックス, ジョージ他

(ii) 発明の名称: 組換えCTLA4ポリペプチドおよびその製造方法

(iii) 配列数: 9

(iv) 連絡住所:

(A) 住所人: シナジェン, インコーポレイテッド

(B) 番地: 1885 33アールディー ストリート

(C) 市: ボールダー

(D) 州: コロラド

(E) 国: アメリカ合衆国

(F) 郵便番号: 80301

(v) コンピューター読み出し形態:

(A) 媒体型: フロッピーディスク, 3.5インチ, 360Kb

(B) コンピューター: IBM互換用

(C) 操作システム: MS-DOS

(D) ソフトウェア: ASCII

(vi) 現在の出願データ: 無し

(vii) 優先権主張の出願データ: 無し

(A) 出願番号:

(B) 出願日:

(viii) 代理人/事務所情報:

(A) 氏名: テレサ, ブラウン エイ.

(B) 登録番号: 32,547

(C) 照会/記録番号: SYNE-275PCT

(ix) 電話回線情報:

(A) 電話: (303) 541-1372

(B) テレファックス: (303) 541-1370

(2) SEQ ID NO:1の情報:

(i) 配列の特色:

(A)長さ：384塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:1:

ATG GCA ATG CAC GTG GCC CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCC AGC AGC CGA GGC ATC	54
Met Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile	
1 5 10 15	
GCC AGC TTT GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGC AAA GGC ACT GAG GTC CGG GTG	108
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val	
20 25 30 35	
ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG GCA ACC TAC	152
Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr	
40 45 50	
ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC ATC TGC ACG GGC ACC TCC	216
Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser	
55 60 65 70	
AGT GGA AAT CAA GTG AAC CTC ACT ATC CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA	270
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly	
75 80 85 90	
CTC TAC ATC TGC AAG GTG GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA	324
Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile	
95 100 105	
GGC AAC GGA ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC	378
Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp	
110 115 120 125	
TGA TAA	384
128	

(3)SEQ ID NO:2の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ：125アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:2:

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val
 20 25 30 35
 Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr
 40 45 50
 Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 55 60 65 70
 Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly
 75 80 85
 Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile
 90 95 100 105
 Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 110 115 120 125

(4)SEQ ID NO:3の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 32塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(xi)配列: SEQ ID NO:3:

CCCCATATGC AATGCACGTG GCCCAGCCTG CT

32

(5)SEQ ID NO:4の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 45塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(xi)配列: SEQ ID NO:4:

CCCCAGCCTG GTACCTTATC AGTCAGAATC TGGGCACGGT TCCTGG

45

(6)SEQ ID NO:5の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ: 33塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:5:

GATCTAGAAT TGTCATGTTT GACAGCTTAT CAT

33

(7)SEQ ID NO:6の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ：37塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：二本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

GAAAATAATA CTGTTGATGG GTGTCTGGTC AGAGACATCA AGAATAACG	700
CCGGAACATT AGTGCAGGCA GCTTCCACAG CAATGGCATC CTGGTCATCC	750
AGCGGATAGT TAATGATCAG CCCACTGACG CGTTGCGCGA GAAGATTGTC	800
CACCGCCGCT TTACAGGCTT CGACGCGGCT TCGTTCTACC ATCGACACCA	850
CCACGCTGGC ACCCAGTTGA TCGGCGCGAG ATTTAATCGC CCGGACCAAT	900
TGCGACGGCG CGTGCAGGGC CAGACTGGAG GTGGCAACGC CAATCAGCAA	950
CGACTGTTTG CCGGCCAGTT GTTGTGCCAC GCGGTTGGGA ATGTAATTCA	1000
GCTTCGCCAT CGCCGCTTCC ACTTTTTCCT GCGTTTTCCT AGAATCGTGG	1050
CTGGCTGGT TCACCACGCG GCAAAACGGT TGAATAGAGA CACCGGCAAT	1100
CTCTGCGACA TCGTATAACG TTACTGGTTT CACATTCACC ACCCTGAATT	1150
GACTCTCTTC CGGGCGCTAT CATGCCATAC CCGGAAAGGT TTTGCACCAT	1200
TCGATGGTGT CGGAATTAAT TCAGCCATGG	1230

(10)SEQ ID NO:9の情報:

(i)配列の特色:

(A)長さ：5アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:9:

Ala Met His Val Ala
1 5

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 94/07685		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K14/705 C12N15/62 C12N1/21 A61K38/17 //(C12N1/21, C12R1:19)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	EP,A,0 613 944 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 7 September 1994 see page 6, line 19 - page 6, line 33; example 2	1-18
X	WD,A,93 00431 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.; US) 7 January 1993 cited in the application see page 11, line 14 - page 20, line 1; examples 2,3	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, i.e. exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document number of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 November 1994		Date of mailing of the international search report 29-11-1994
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Nauche, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 94/07685

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0613944	07-09-94	AU-B- 5390194	28-07-94
		CA-A- 2113744	23-07-94
		FI-A- 940270	23-07-94
WO-A-9300431	07-01-93	AU-A- 2240092	25-01-93
		CA-A- 2110518	07-01-93
		EP-A- 0606217	20-07-94
		PT-A- 100637	31-05-94

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶ 識別記号 片内整理番号 F I

C 12 N 1/21 8828-4B

C 12 P 21/02 C 9282-4B

(81)指定国 EP(AT BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG
CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,
ID, IG), AI, AU, BB, BG, BR, BY,
CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, G
B, HU, JP, KP, KR, LK, LU, LV, MG
, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO
RU, SD, SE, SK, UA, US, UZ, VN

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.